

METHODISCHE ENTWICKLUNGSARBEITEN
UND MODELLVERSUCHE
ZUR ANALYTISCHEN KONTROLLE
DER ILLEGALEN ANWENDUNG VON ANABOLIKA
IN DER KÄLBERMAST

Peter Funcke

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554818_0118

Aus dem Institut für Physiologie
der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
- Technische Universität München -
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg

vorgelegt über das Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

METHODISCHE ENTWICKLUNGSARBEITEN UND MODELLVERSUCHE

ZUR ANALYTISCHEN KONTROLLE DER ILLEGALEN ANWENDUNG

VON ANABOLIKA IN DER KÄLBERMAST

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

A r n d t - P e t e r F u n c k e

aus

Dortmund

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. M. Rüsse

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Problemstellung und Literatur	1
1.	Situation der Anabolikaanwendung.....	1
2.	19-Nortestosteron.....	3
3.	Medroxyprogesteronacetat.....	6
4.	Östradiolbenzoat.....	6
5.	Nachweisverfahren für anabole Steroidhormone.....	7
6.	Aufgabenstellung.....	10
II.	Material, Methoden, Versuchs- anordnungen	11
1.	Materialien	11
a)	Chemikalien.....	11
b)	Biochemika.....	11
c)	Lösungsmittel.....	12
d)	Puffer und Lösungen.....	12
e)	Geräte	16
2.	Aufarbeitung der Proben.....	17
a)	Aufarbeitung von Urin- und Plasmaproben für den RIA bzw. EIA.....	17
b)	Aufarbeitung von Urin- und Muskelproben für den HPLC-EIA.....	17
c)	Aufbereitung der Muskelproben aus Injektionsstellen für den HPLC-RIA bzw. den HPLC-EIA.....	18
3.	Radioimmuntest für 19-Nortestosteron.....	19
4.	Enzymimmuntest für 19-Nortestosteron.....	20
a)	Entwicklung des Testverfahrens.....	20
aa)	Gewinnung von 19-Nortestosteronglucuronid mit- tels biotechnischer Methode.....	20
ab)	Reinigung und Identifizierung des 19-Nortesto- steronglucuronids.....	21

ac.	Kopplungen von 19-Nortestosteronglucuronid an alkalische Phosphatase.....	24
ad.	Kopplung von 19-Nortestosteronglucuronid an Meerrettich-Peroxidase.....	25
b)	Durchführung des Enzymimmuntests.....	25
ba.	Phosphatase-System.....	26
bb.	Peroxidase-System.....	26
c)	Präzision und Reproduzierbarkeit der Messungen.....	27
d)	Validierung der Meßergebnisse des Enzymimmuntests mittels HPLC.....	28
e)	Weiterentwicklung der Methodik des Enzymimmuntests.....	29
5.	Trennungen verschiedener Steroidverbindungen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	30
6.	Untersuchungen über Anabolikarückstände in Injektionsstellen behandelter Kälber.....	30
a)	Versuchsanordnungen (illegaler Cocktail).....	30
b)	Versuchsanordnung (veterinärmedizinische Präparate).....	32
c)	Einsatz eines HPLC-Gradientensystems für 19-Nortestosterondekanat, Östradiolbenzoat und Medroxyprogesteronacetat aus Rückständen eines illegalen Hormoncocktails mit anschließendem Enzymimmuntest bzw. Radioimmuntest.....	33
d)	Einsatz eines isokratischen HPLC-Systems für 19-Nortestosterondekanat und -laurat aus Rückständen veterinärmedizinischer Injektionspräparate mit anschließendem Enzymimmuntest.....	35
7.	Ausscheidung verschiedener parenteral verabreichter 19-Nor-Steroide und deren Bestimmung im Urin von Kälbern.....	36
a)	Versuchsanordnung.....	36
b)	Enzymimmunologische Bestimmung von Norethindron, Norethynodrel und Norgestrel mit vorgeschalteter HPLC.....	37

8. Untersuchungen von Urinproben Antibiotika-behandelter Kühe im Hinblick auf mögliche Kreuzreaktionen im Nor-testosteron-EIA.....	37
9. HPLC-EIA für Trenbolon im Muskel.....	37
III. E r g e b n i s s e.....	40
1. Identifizierung und Gewinnung von 19-Nortestosteron-glucuronid.....	40
2. Enzymimmuntest für 19-Nortestosteron.....	45
3. Trennungen verschiedener Steroidverbindungen mittels-HPLC.....	53
4. Injektionsstellen.....	59
5. Ausscheidung von Norethisteron, Norethynodrel und Nor-gestrel über den Urin beim Kalb und deren Bestimmung im HPLC-EIA.....	66
6. Untersuchung von Urinproben Antibiotika-behandelter Kühe im Hinblick auf mögliche Kreuzreaktionen im Enzym-immuntest.....	70
7. HPLC-EIA für Trenbolon in Muskulatur.....	70
IV. D i s k u s s i o n.....	72
V. Z u s a m m e n f a s s u n g.....	78
VI. S u m m a r y.....	80
VII. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s.....	82
L e b e n s l a u f.....	93

I. Problemstellung und Literatur

1. Situation der Anabolikaanwendung

Seitdem anabol wirksame Sexualhormone zur Förderung der Mastleistung bei Nutztieren angewendet werden, besteht auch die öffentliche Diskussion um Nutzen und Risiko der sog. "Hormonmast". Die Vorteile einer gezielten Anwendung von Anabolika in manchen Produktionsbereichen liegen im Zuwachs von echtem Muskeleiweiß und einer verbesserten Futterverwertung (Übersichten bei LU & RENDEL 1976, BRÜGGEMANN & RICHTER 1976). Unter gezielter Anwendung ist zu verstehen, daß die erwünschten positiven Wachstumseffekte nur bei Tieren erzielt werden können, bei denen ein sog. "Hormondefizit" (KARG 1964) besteht, also bei juvenilen Tieren (Kälbermast), Frühkastraten (Ochsenmast) und weiblichen Tieren (Färsenmast). In den Ländern der Europäischen Gemeinschaft spielt die Kälbermast eine bedeutende Rolle. Bei Mastkälbern lassen sich unter Hormonsubstitution durchschnittliche Mehrzunahmen von 10 - 15 % erzielen (VAN DER WAL 1975, VAN WEERDEN et al. 1981). Somit bestand bei den Produzenten ein verständliches Interesse an diesen Wachstumsförderern.

Die in der Tierproduktion angewandten Sexualhormone können entsprechend ihrer chemischen Natur in körpereigene (Östradiol, Testosteron, Progesteron) und körperfremde Steroidhormone (z. B. Trenbolon, Methyltestosteron) sowie in nicht steroidale Xenobiotika (z. B. Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol) eingeteilt werden. Von diesen Verbindungen haben die Stilbenderivate, vor allem das Diethylstilbestrol (DES), wohl die größte negative Bekanntheit im Zusammenhang mit dem "Östrogenskandal" zu Beginn der 80er Jahre erreicht. Die Tatsache, daß mit dem DES eine Substanz in die Babynahrung gelangt war, die neben ihrer hormonellen Wirkung auch eine cancerogene bzw. cocancerogene Eigenschaft besitzt (HERBST et al. 1971), hat in der Öffentlichkeit wesentlich zu einer generellen Ablehnung der hormonell unterstützten Kälbermast beigetragen.

Um eine Versachlichung der Problematik bemüht, haben sich zahlreiche Wissenschaftler mit der objektiven Risikoabschätzung für den Verbraucher beschäftigt. Insbesondere wurde der Einsatz aus-

schließlich natürlicher Hormone untersucht, da sich die erwünschten Wachstumssteigerungen bereits mit geringen Mengen physiologischer Sexualhormone (μg -Bereich), über einen längeren Zeitraum verabreicht erzielen lassen. In Versuchen mit Langzeitimplantaten konnte gezeigt werden, daß bei sachgemäßer Applikation, d.h. Entfernung des Hormondepots spätestens beim Schlachtprozess, die Rückstände solcher exogen zugeführten Hormone im eßbaren Gewebe sich weder qualitativ noch quantitativ von den endogenen Gewebsspiegeln unterscheiden lassen (MEYER et al. 1984, 1985).

Während in den USA, Großbritannien, Irland, Neuseeland und Australien derartige Präparate behördlich zugelassen und legal angewendet werden, konnte man sich beispielsweise in der BRD, Italien und den Niederlanden nicht entschließen, durch die Zulassung bestimmter unbedenklicher Hormonpräparate eine kontrollierbare Situation zu schaffen. Ebensowenig ist durch das vom EG-Minister rat am 20. Dezember 1985 beschlossene generelle Verbot der Hormonanwendung zu Mastzwecken eine Lösung des Interessenkonflikts zu erwarten. Schon heute kann eine fortschreitend illegale Anwendungspraxis beobachtet werden. Wie der Hormonskandal von 1985 in Norddeutschland, aber auch Untersuchungen aus anderen europäischen Ländern gezeigt haben, handelt es sich bei den in Umlauf befindlichen Anabolikazubereitungen um nicht deklarierte Hormonmixturen, deren Dosierung und Applikationsort unbekannt sind. Damit erhöht sich das Risiko für den Verbraucher, mit dem Verzehr von Fleisch ungewollt größere Hormonmengen aufzunehmen. Bei Rückstandsmengen von einigen Milligramm pro Injektionsstelle sind auch hormonelle Störungen beim Verbraucher nicht auszuschließen. Die stoffliche Zusammensetzung derartiger Hormoncocktails besteht zu wesentlichen Anteilen aus Hormonen, die in der Humanmedizin angewendet werden (z. B. Medroxyprogesteronacetat) bzw. aus der Dopingpraxis bekannt sind (19-Nortestosteron). JANSSEN et al. (1984) wiesen in 96 von 117 untersuchten Injektionsstellen 19-Nortestosteron und in weiteren 30 Proben Medroxyprogesteronacetat nach und beobachteten für die Niederlande einen Trend zur illegalen Anwendung von 19-Nortestosteron in Kombination mit Östradiolbenzoat und/oder Medroxyprogesteronacetat und ihren Estern. Bei den von MORETTI et al. (1984) untersuchten Injektionspräparaten aus italienischen Schwarzmarktbeständen handelte es sich um ölige Zubereitungen von 19-Nortestosteron-dekanat, Östradiolbenzoat und

Medroxyprogesteronacetat. Diese Ergebnisse wurden auch durch eigene Untersuchungen von beschlagnahmten Hormoncocktails aus Niedersachsen bestätigt (RAPP & MEYER 1987).

Um den Verbraucher vor negativen Auswirkungen der illegalen Anwendungspraxis zu schützen, ist eine effiziente Rückstandsüberwachung notwendig. Da in der Regel bei einer normalen Fleischschau keine Injektionsstellen aufgefunden werden, müssen empfindliche Meßmethoden für den Nachweis auch kleinster Mengen (ppb- bis ppt-Bereich) von Hormonen bzw. deren Metaboliten in Geweben und Exkreten herangezogen werden. Die Situation wird dadurch erschwert, daß sich das Spektrum der infrage kommenden Hormone erheblich erweitert hat und daß deren Metabolismus im Rind teilweise noch unbekannt ist.

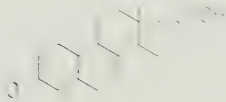
2. 19-Nortestosteron

Als Derivat des Testosterons gehört das 19-Nortestosteron =17 β -hydroxy-4-estren-3-on (19-NT; Abb. 1) zu den Anabolika im engeren Sinne. In seiner anabolen Wirkung gleicht es nahezu dem Testosteron (rel. anabole Aktivität >1). Infolge seiner Strukturmodifikation (Fehlen der C₁₉-Methylgruppe) besitzt es jedoch eine erheblich geringere androgene Wirkung als dieses (rel. androgene Aktivität = 0,05, myotrop/androgener Index = 20; NEUMANN 1976). Die androgene Komponente macht sich daher vornehmlich bei Langzeitbehandlungen bzw. im höheren Dosierungsbereich bemerkbar. Beim Mann führte eine Injektionsbehandlung von 23x100 mg NT-propionat innerhalb von 13 Wochen als Folge des negativen Feedback zu einer (reversiblen) Abnahme des Hodengewichts um 50% sowie einer Azospermie, die sich nach Therapieende nur langsam normalisierte (SCHUERMEYER et al. 1984).

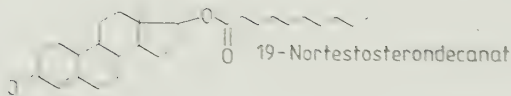
19-Nortestosteron wird in der Human- und Veterinärmedizin hauptsächlich als Roborans bei verschiedenen inneren Erkrankungen, zur Unterstützung der Rekonvaleszenz nach Operationen, Infektions- und Stoffwechselkrankheiten und Parasitosen, bei Kümern und Schwächezuständen bei Neugeborenen und Jungtieren sowie in der Geriatrie therapeutisch eingesetzt. In weitaus größerem Maße wird das Hormon jedoch illegal als Dopingmittel im Hochleistungssport



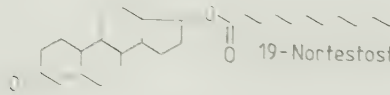
19-Nortestosteron - 1717



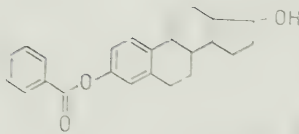
Testosteron



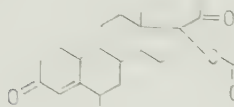
19-Nortestosterondecanat



19-Nortestosteronlaurat



Östradiolbenzoat



Medroxyprogesteronacetat

Abb. 1: Strukturformeln sexualhormonwirksamer Anabolika

sowie im Pferdesport angewendet (Übersicht bei HAMPL et al. 1985). Seit wenigen Jahren wird zunehmend sein Mißbrauch als Masthilfsmittel in der Kälbermast beobachtet (JANSEN et al. 1984).

Nortestosteron-Ester (-phenylpropionat, -cyclohexylpropionat, -decanat, -undecanat, -dodecanat = -laurat) befinden sich als Injektionspräparate im Handel. In der BRD sind das NT-decanat (Anabolicum^R) und das NT-laurat (Fortadex^R 25; Laurabolin^R) für die Anwendung in der Veterinärmedizin zugelassen (Abb.1). Durch die Veresterung der freien OH-Gruppe verlängert sich die Wirkungsdauer von 19-Nortestosteron: so betrugen nach Verabreichung von je 50 mg Ester die Halbwertszeiten von NT-decanat 8 Tage und von NT-hydroxyphenylpropionat 21 Tage (BELKIEN et al. 1985). Aus Muskeldepots wird durch Esterspaltung relativ schnell das 19-Nortestosteron-17 β freigesetzt (FRISCHKORN & DÜRBECK 1978). Dieses wird ebenfalls rasch metabolisiert (BOTH-MIEDEMA et al. 1972) und über die Galle und den Urin ausgeschieden. Sein Stoffwechsel konnte bei Mensch und Tier jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden. Beim Menschen scheinen das Norandrosteron und das Noretiocholanolon die Hauptmetaboliten im Urin zu sein (STARKA et al. 1982). Beim Tier bestehen offensichtlich erhebliche tierartliche Unterschiede. Während beim Kaninchen 5 β -Estran-3 α , 5 β -Estran-3 β sowie 5 β -Estran-17 β -diol im Urin nachgewiesen werden konnten (BOTH-MIEDEMA et al. 1972), wurden beim Pferd Estran-3,17-diols, verschiedene 16-hydroxylierte Verbindungen sowie Norandrosteron und Noretiocholanolon im Urin bestimmt (HOUGHTON et al. 1978, HOUGHTON & DUMASIA 1980). Beim Kalb konnten keine Metaboliten des 5 β -Reduktaseweges, dafür aber freies 19-Nortestosteron im Urin gefunden werden. Bei Untersuchungen von 600 Injektionsstellen von nachweislich mit Nortestosteron behandelten Mastkälbern wurden mittels HPLC-RIA Konzentrationen zwischen 0 und 5 ng/ml Urin gemessen (JANSEN et al. 1986a). Die Höhe der über den Urin ausgeschiedenen Nortestosteronmengen wurde in einem Injektionsversuch am Kalb bestätigt. Nach i.m.-Applikation von 50 mg NT-laurat und 5 mg Östradiolbenzoat fanden sich im Urin weniger als 4 ng Nortestosteron/ml (JANSEN et al. 1986b). Da beim Rind die Inaktivierung von Steroiden mit freien β -Hydroxylgruppen durch eine Epimerisierung zur -17 α -Form stattfinden kann und

diese Umwandlung z. B. für das Trenbolon den Hauptstoffwechselweg darstellt, ist auch beim Nortestosteron mit dem Auftreten von 19-Nortestosteron-17a zu rechnen.

3. Medroxyprogesteronacetat

Beim Medroxyprogesteronacetat =17a-acetoxy-6a-methyl-4-pregnen-3,20-dion (MPA) handelt es sich um ein xenobiotisches Steroidhormon (Abb.1). Es entwickelt beim Menschen nach oraler oder parenteraler Verabreichung eine starke gestagene Wirkung (BABCOCK et al. 1953, SALA et al. 1958) und besitzt antiöstrogene, antiandrogene und antigonadotrope Eigenschaften (FRASER & WEISBERG 1981). Beim Tier zeigt es ebenfalls gestagene sowie androgene Effekte, wobei die Intensität der einen oder anderen Wirkkomponente speziesabhängig variiert.

MPA (Clinovir^R, Parlutal^R) wird in der Gynäkologie zur Behandlung von dysfunktionellen Blutungen (10-20 mg pro Tag), von Zyklusstörungen (5-10 mg pro Tag) sowie von Mamma- und Endometriumkarzinomen (0,5-1 g pro Tag) eingesetzt und ist der Wirkstoff der "Drei-Monat-Spritze" für die parenterale Kontrazeption (Depo-Clinovir^R, 150 mg MPA). Seine Eignung für die Fertilitätskontrolle beim Nutztier wurde untersucht (Sletholt 1981).

In Untersuchungen zum Stoffwechsel von MPA beim Menschen konnten mindestens 11 verschiedene Metaboliten im Urin identifiziert werden (CASTEGNARO & SALA 1962, HELMREICH & HUSEBY 1962, MARTIN & ADLERCREUTZ 1977, FUKUSHIMA et al. 1979, MARTIN et al 1980). Der Metabolismus beim Rind ist derzeit noch ungeklärt.

4. Östradiolbenzoat

In verschiedenen Untersuchungen konnte die Eignung von Östradiol (Abb. 1) als Anabolikum in der Kälbermast bewiesen werden (TRENKLE 1975, VAN DER WAL 1975, GROPP et al. 1976). Wegen der zu geringen oralen Wirksamkeit des Östradiols wurden parenterale Applikationsformen mit Langzeitwirkung entwickelt (Presslinge, wirkstoffgefüllte Kunststoffimplantate; Synovex^R, Compudose^R,

V-Implix^R).

Die Untersuchungen auf Östrogenrückstände in eßbaren Geweben ergaben, daß bei korrekter Anwendung des applizierten Östrogenpräparates sich die Rückstände, wenn sie sich überhaupt als solche von physiologischen Werten unterscheiden ließen, keinerlei Gefahr für den Verbraucher darstellten (HOFFMANN et al. 1975, MEYER et al. 1984, 1985). Wird ein Präparat dagegen unsachgemäß angewandt, ist ein Risiko für den Verbraucher nicht auszuschließen. KARG et al. (1984) fanden nach intramuskulärer Injektion von 50 mg Östradiolbenzoat in öliger Lösung und einer Wartezeit von 21 Tagen noch 14,6 µg in der Injektionsstelle wieder.

5. Nachweisverfahren für anabole Steroidhormone

Die Bestimmung von Rückständen sexualhormonwirksamer Anabolika erfordert sowohl spezifische und genügend empfindliche Suchmethoden, mit deren Hilfe große Probenanzahlen ausgewertet werden können, als auch zuverlässige Referenzverfahren für die Befundbestätigung.

Der Radioimmuntest (Radioimmunoassay, RIA) hat sich wegen seiner hohen Spezifität und Empfindlichkeit (unterer pg-Bereich) als praktikables Routineverfahren für die Hormonanalytik durchgesetzt.

Für die Bestimmung von 19-Nortestosteron existieren bereits radioimmunologische Verfahren (JONDORF 1977, HAMPL et al. 1979, HAMPL & STARKA 1979, JANSEN et al. 1985a, RAPP & MEYER 1987, VOGT 1987). Einen RIA für Medroxyprogesteronacetat im Serum bzw. Plasma entwickelten CORNETTE et al. (1971). Weitere Tests beschreiben z.B. ROYER et al. 1974, SHRIMANKER et al. 1978, SLETHOLT 1981). Eine Übersicht über die verfügbaren Radioimmuntests für natürliche Steroidhormone ist bei KARG et al. (1984) verzeichnet.

Eine Analyse mittels Radioimmuntest können nur diejenigen Anwender durchführen, die zum Umgang mit radioaktiven Substanzen berechtigt sind und über die nötige Laborausrüstung verfügen. Die radioaktiven Abfälle verursachen hohe Entsorgungskosten und stellen zudem eine Umweltbelastung dar. Deshalb wurde nach einem Ersatz der radioaktiven Markierung gesucht.

Gleichzeitig sollte das neue Testsystem aber die gleiche Empfindlichkeit und Spezifität wie der RIA aufweisen und ebenso praktikabel sein. Diesen Anforderungen genügt der Enzymimmuntest (EIA) auf Mikrotitrationsplatten.

Im Steroid-EIA konkurrieren unmarkiertes und Enzym-markiertes Hormon um die Bindungsstellen am Antikörper. Nach der Immunreaktion wird das freie Hormon vom gebundenen Anteil getrennt und die Enzymaktivität durch eine Farbreaktion (colorimetrische bzw. fluorimetrische Endpunktbestimmung) gemessen. Die Empfindlichkeit des Enzymimmuntests wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Wegen des bekannten "bridge recognition"-Phänomens (VAN WEEMEN & SCHUURS 1975) muß eine homologe Konjugation von Enzym und Antigen vermieden werden. Die Kopplungsposition (also die Stelle, an der Hormon bzw. Antigen an die jeweilige Brücke gekoppelt werden) und die Länge der verwendeten Brücken spielen ebenfalls eine erhebliche Rolle (EXLEY 1978, HOSHODA et al. 1986). Durch die Ausnutzung des Multiplikationseffekts der Enzyme kann und muß das molare Konzentrationsverhältnis von Enzym zu Hormon im Kopplungsprodukt niedrig gehalten werden, um empfindliche Tests zu erhalten (HOSHODA et al. 1985).

Für die Rückstandsanalytik bzw. die Fertilitätskontrolle stehen derzeit mehrere Enzymimmuntests auf Mikrotitrationsplatten zur Verfügung, so für die Bestimmung von Trenbolon und Diethylstilbestrol (MEYER & HOFFMANN 1987), für Progesteron in Milch und Plasma (VAN DE WIEL & KOOPS 1982, MEYER et al. 1986) und für Östronsulfat in Milch (GREGOR & MEYER 1985).

Die Spezifität immunologischer Nachweismethoden hängt von der Spezifität des verwendeten Antikörpers ab. Die Wahrscheinlichkeit, falsch positive Ergebnisse zu erhalten ist umso geringer, je weniger das Antiserum mit anderen, dem Antigen verwandten Substanzen kreuzreagiert. Für die Absicherung positiver Resultate kann man sich physikalischer Verfahren bedienen, wobei die Kombi-

nation von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS) eine spezifische und zuverlässige Erfassung von Rückständen im ppb-Bereich ermöglicht. Die Nachteile dieses Verfahrens liegen in hohen Kosten und dem erheblichen Zeitaufwand für Probenaufbereitung und Analysengang. Da nicht immer Proben im höheren Konzentrationsbereich, sondern oftmals Muskel-, Fett- und Plasmaproben mit erheblich niedrigeren Hormongehalten untersucht werden müssen, reichen für den ppt-Bereich rein physikalische Verfahren nicht aus. Deshalb wurde die hohe Selektivität der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit der hohen Empfindlichkeit und Spezifität des Radioimmuntests im HPLC/RIA für Diethylstilbestrol (JANSEN et al. 1985c) und Trenbolon (RAPP & MEYER 1985) verbunden. Bei parallelen Untersuchungen konnten keine qualitativen und quantitativen Diskrepanzen zwischen HPLC/RIA und HPLC/GC/IDMS (HPLC/Gaschromatographie/Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie) für Diethylstilbestrol gefunden werden (JANSEN et al. 1986c). Bei der letztgenannten Methode wird eine definierte Menge ^2H -DES zur jeweiligen biologischen Probe zugesetzt. Nach Aufarbeitung und GC/MS kann eine Gehaltsberechnung aus dem Massenverhältnis der Molekülpeaks vorgenommen werden.

6. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein empfindliches enzymimmunologisches Routinenachweisverfahren für 19-Nortestosteron auf Mikrotitrationsplatten entwickelt werden. Da die Kopplung an das Enzym über das Glucuronid von 19-Nortestosteron-17a vorgenommen werden sollte, mußte zunächst das benötigte 19-Nortestosteronglucuronid biotechnisch über das Kalb gewonnen werden.

Dieser Test sollte dann auf seine Eignung für die Bestimmung biologischer Urinproben untersucht werden, wobei auch ein Vergleich mit radioimmunologisch bestimmten Ergebnissen vorgenommen werden sollte.

Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit sich die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Kombination mit dem Enzymimmuntest für eine Validierung positiver Befunde im ppt-Bereich eignet.

Auch sollte die Selektivität der HPLC in Bezug auf die Trennung xenobiotischer von physiologischen Steroidhormonen geprüft werden, wobei der Einfluß des Elutionsmittels auf die Trennleistung gezeigt werden sollte.

Einen weiteren Schwerpunkt bildeten Injektionsversuche am Kalb, bei denen eine unsachgemäße intramuskuläre Applikation eines nicht deklarierten Injektionspräparates simuliert werden sollte. Ziel sollte es sein, die Hormonrückstände an der Injektionsstelle nach verschiedenen langen Wartezeiten zu bestimmen und anhand der tatsächlich in einer kontaminierten Fleischportion enthaltenen Hormonmengen das mögliche Risiko für den Verbraucher abzuschätzen.

II. Material, Methoden, Versuchsanordnungen

1. Materialien

a) Chemikalien

Isobutylchloroformat (SIGMA I-3253)
 4-Methylmorpholin (MERCK 805894)
 Szintillationsflüssigkeiten Rialuma (BAKER 8582) und
 Xylofluor (BAKER 9061)

b) Biochemika

Betamethason (SIGMA B-7005)
 Cortison (SERVA 17560)
 Dexamethason (SIGMA D-1756)
 Eptestosteron (SIGMA E-5878)
 Flumethason (SIGMA F-9507)
 β -Glukuronidase/Arylsulfatase von *Helix pomatia*, 12/60 U/ml
 (MERCK 4114)
 β -Glukuronidase aus *E. coli* (BOEHRINGER 127051)
 Medroxyprogesteronacetat (SIGMA 1629)
 ^3H -Medroxyprogesteronacetat (NEW ENGLAND NUCLEAR, Boston;
 60 Ci/mmol)
 Melengestrolacetat (UPJOHN U-21, 240)
 Methyltrienolon (ROUSSEL UCLAF)
 ^3H -Miboleron (AMERSHAM, Braunschweig)
 19-Norandrostendion (SCHERING AG, Berlin)
 Norethindron (SIGMA N-4128)
 Norethynodrel (SIGMA N-7253)
 Norgestrel (SIGMA N-2260)
 ^3H -19-Nortestosteron (AMERSHAM, Braunschweig; 19 Ci/mmol)
 19-Nortestosteron-17a (SCHERING AG, Berlin)
 19-Nortestosteron-17 β (SIGMA N-7252)
 19-Nortestosteron-17-Dekanat (SIGMA N-6633)
 Östradiol-17a (SIGMA E-8750)
 Östradiol-17 β (SERVA 31100)
 Östradiolbenzoat (SIGMA E-8875)
 Östron (PAESEL GmbH & Co, Frankfurt, 28-812-020)
 Peroxidase aus Meerrettich (BOEHRINGER MANNHEIM 413470)

Alkalische Phosphatase (SIGMA P-0405)
p-Nitrophenylphosphat (SIGMA 104-40)
Prednisolon (SIGMA P-6004)
Progesteron (SIGMA P-0130)
Rinderserumalbumin (SERVA 11930)
Testosteron (SERVA 35800)
Trenbolon-17a (ROUSSEL UCLAF)
Trenbolon-17B (ROUSSEL UCLAF)
Trendion (ROUSSEL UCLAF)
Triamcinolon Acetonid (SIGMA T-6501)

c) Lösungsmittel

Methanol (BAKER 8045)
Acetonitril (MERCK 4727)
Tert. Butylmethylläther (MERCK 1995)
Petroläther, 40 - 60 °C (MERCK 910)
N,N-Dimethylformamid (MERCK 2937)

d) Puffer und Lösungen

Acetatpuffer 50 mM, pH 4,8
4,75 g/l Na-Acetat x 3 H₂O (MERCK 6267)
mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen

Acetatpuffer 0,5 mM, pH 4,8
47,5 g/l Na-Acetat x 3 H₂O (MERCK 6267)
mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen

Assay-Puffer (für alkalische Phosphatase) pH 7,5
20 mM TRIS = 2,42 g/l
1:200 Stabilisator = 5 ml/l
0,3 M NaCl = 17,52 g/l
pH 7,5 mit 1 N HCl einstellen, danach Zugabe von
1 g/l Rinderserumalbumin

Assay-Puffer (für Peroxidase) pH 7,2

40 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ = 7,12 g/l (MERCK 6580)

0,145 M NaCl = 8,5 g/l (MERCK 6404)

1,0 g/l Rinderserumalbumin (SERVA 11930)

pH 7,2 mit 5 N HCl einstellen

Chromatographie-Puffer pH 8,0

20 mM Glycin = 1,502 g/l

1 mM MgCl_2

0,1 mM ZnCl_2

0,15 M NaCl = 8,76 g/l

pH 8,0 mit 1 N NaOH einstellen, danach Zugabe von

0.001 % Rinderserumalbumin = 10 mg/l

1. Coating-Puffer pH 9,6

4,29 g/l Na_2CO_3 (MERCK 6391)

2,93 g/l NaHCO_3 (MERCK 6329)

pH 9,6 mit 1 N HCl einstellen

2. Coating-Puffer

1 g Rinderserumalbumin / 100 ml PBS-Puffer pH 7,2

2. Coating-Puffer (modifiziert)

= Assay-Puffer für alkalische Phosphatase

Formiatpuffer pH 4,0

50 mM Na-Formiat (MERCK 6443)

pH 4,0 mit Ameisensäure einstellen

Gelatinepuffer pH 7,2

1,0 g Gelatine weiß extrafein DAB 7 (MERCK 4972)

Phosphatpuffer pH 7,2 ad 1,0 l

Gelatine-Albumin-Puffer 0,14 %

1,4 g Rinderserumalbumin

Gelatinepuffer pH 7,2 ad 1,0 l

Kohlesuspension 0,4 %

4,0 g Aktivkohle Norit A (SERVA 30890)

0,4 g Dextran (SERVA 18680)

H₂O bidest. ad 1,0 l

PBS-Puffer pH 7,2

1,265 g/l NaH₂PO₄ x H₂O (MERCK 6346)

12,1 g/l Na₂HPO₄ x 12 H₂O (MERCK 6579)

8,5 g/l NaCl

auf pH 7.2 einstellen

Phosphatpuffer 67 mM pH 7,2

20 mM KH₂PO₄

47 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

5,4 mM NaN₃

5,0 ml/l Stabilisator

Stabilisator

0,3 M EDTA (Titriplex III MERCK) = 111,7 g

1 % Acetylsalicylsäure = 10,0 g

Substanzen in 800 ml Aqua bidest. aufnehmen; pH 7,0

mit 15% NaOH einstellen; Aqua bidest. ad 1,0 l

Stoppreagenz für alkalische Phosphatase

0,5 M K₂HPO₄ x 3 H₂O

0,01 M EDTA

pH 10,0 mit 1 N NaOH einstellen

Stoppreagenz für Peroxidase

4 N H₂SO₄

Substratlösung für alkalische Phosphatase

5 mg p-Nitrophenylphosphat/5 ml Substratpuffer

Substratlösung für Peroxidase

400 µl TMB = 1 ml Dimethylsulfoxid (SERVA 20385)

+ 6 mg Tetramethylbenzidin (FLUKA AG 259632)

100 µl 1%-ige H₂O₂ (MERCK 8600)

ad 25 ml Substratpuffer

Substratpuffer für alkalische Phosphatase pH 9,8

105 g Diethanolamin/l (SIGMA D 8885)

1 M MgCl_2

0,1 M ZnCl_2

pH 9,8 mit 5 N HCl einstellen

Substratpuffer für Peroxidase pH 5,5

0,1 M CH_3COONa = 8,206 g/l (MERCK 6268)

pH 5,5 mit Zitronensäure einstellen

Triethanolamin-HCl-Puffer 10 mM, pH 7,2

10 mM Triethanolamin (MERCK 8379)

pH 7,2 mit 1 N HCl einstellen

TRIS-Puffer 20 mM, pH 8,5 (20% Methanol)

2,42 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MERCK 8362)

800 ml H_2O bidest.

pH 8,5 mit 1 N HCl einstellen

200 ml Methanol

TRIS-Acetat-Puffer pH 7,2

20mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan = 2,42 g/l

1 mM NaN_3 = 65 mg/l

900 ml H_2O bidest.

pH 7,2 mit Essigsäure einstellen

H_2O bidest. ad 1000 ml

TRIS-Citrat-Puffer pH 5,0

20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan = 2,42 g/l

pH 5,0 mit Zitronensäure einstellen

(MERCK 244)

Waschlösung für EIA

0,5 g Polyoxyethylene Sorbitan Mono - Oleate

(Tween 80; SIGMA P-1754)

H_2O bidest. ad 1000 ml

e) Geräte

EIA: Kleindispensetten 50-250 μ l, Mikrodispenser
Modell 500 (Nichiryo)

Mikrotitrationsplatten
(Immunoplate I, F-96, No. 4-39454, Nunc, Dänemark)

Mikrotitrationsplattenschüttler (DSG-Titer-
tek^R, Flow Laboratories)

Mikrotitrationsplattenwaschgerät (Virion Würzburg)
8-Kanal-Photometer (Titertek-Multiskan^R Typ
310 C (Flow Laboratories)

HPLC: Pumpen "µ-Flow": Beckmann 112 Solvent Delivery Module

Säulen: Altex Ultrasphere ODS, RP-18, 250 x 4.6 mm;

5 μ m

LiChroCART HPLC-Cartridge RP-18, 250 x 4 mm;

5 μ m (Nr. 528026)

Hibar LiChroCART RP-18, 50 x 4 mm; 5 μ m

LiChroprep RP-18, 310 x 25 mm, 40-63 μ m;

5 μ m

LiChrosorb RP-18 Glaskartusche, 150 x 3 mm;

5 μ m

Steuergerät: Beckmann 421 Controller

Thermostat: Haake Typ FE, Karlsruhe

Photometer: Biotronic^R UV-Detektor BT 3030

Fraktionssammler: Fraction Collector FRAC-
100, Pharmacia Fine Chemicals

Sonstige: C₁₈-RP-Silikagelkartuschen, (BAKER 7020-1)
SepPak^R C₁₈-RP-Silikagelkartuschen (Waters
Associates 51910)

Sephadex-Säule: Sephadex G-25 Fine, Pharmacia
Fine Chemicals

Dialyseschlauch SERVAp^R, 7 mm $\varnothing$ (SERVA
44142)

2. Aufarbeitung der Proben

a) Aufbereitung biologischer Urin- und Plasmaproben für den RIA bzw. EIA

Urin:

0,5 ml Urin wurden mit 2 ml Acetatpuffer (50 mM; pH 4,8) und 8 µl β-Glucuronidase (aus *Helix pomatia*) versetzt und 2 Stunden bei 37 °C hydrolysiert. Nach Zugabe von 100 µl internem Standard (ca. 2000 cpm ³H-19-Nortestosteron-17β/100 µl Methanol) wurden die Hydrolysate über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen gereinigt. Die Octadecyl-Silikagel-Kartuschen wurden vor Gebrauch sowie nach jedem Probendurchgang mit 2 ml 100 % Methanol gewaschen und mit 2 ml TRIS-Puffer (20 mM; pH 8,5; 20% MetOH) äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde mit 2 ml TRIS-Puffer reäquilibriert und danach mit 3 ml 50 % Methanol gewaschen. Zuletzt wurde die Probe mit 1 ml 80 % Methanol von der Kartusche eluiert.

Plasma:

1 ml Plasma wurde mit 100 µl internem Standard vermischt und mit 2 x 3 ml tert. Butylmethyläther extrahiert, wobei 10 Min. stark geschüttelt, 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert und die wässrige Phase ausgefroren wurde. Aus den vereinigten Überständen wurde der Äther im 65 °C Wasserbad evaporiert und der Rückstand in 0,5 ml Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 4,5 ml Aqua bidest. (= Verdünnung auf 10 % Methanol) wurde die Kartuschenreinigung wie bei Urin beschrieben durchgeführt.

b) Aufarbeitung von Urin- und Muskelproben für den HPLC-EIA

Urin für 19-Nortestosteronbestimmung:

Die Aufarbeitung von Urinproben wurde bis zur Elution mit 1 ml 80%-igem MetOH wie in a) durchgeführt. Die weitere Vorbereitung der Kartuscheneluate richtete sich nach den Ergebnissen der vorangegangenen enzymimmunologischen Untersuchung, sowie nach dem

jeweiligen HPLC-System (Probenauftragsvolumen, Art und Konzentration des Laufmittels). Folgende Varianten wurden angewendet:

- Verdünnung der Eluate auf 20 - 40 % MeOH mit H_2O bid.
- Evaporation der Eluate und Wiederaufnahme mit der gleichen oder einer definierten geringeren Menge an 40 %igem MeOH.
- Evaporation der Eluate und Wiederaufnahme mit der gleichen oder einer definierten geringeren Menge an 25 %igem CH_3CN .

Muskel für Trenbolonbestimmung:

10 g Muskelgewebe, gründlich von Fett, Bindegewebe, Sehnen und Blutgefäßen befreit, wurden die gleiche Menge Phosphatpuffer (67 mM, pH 7,2) zugesetzt und homogenisiert. 8 g dieses Homogenats wurden in Extraktionsgläser eingewogen und mit 2 x 8 ml tert. Butylmethyläther extrahiert, wobei die Proben 20 min. geschüttelt, 10 min. bei 3000 rpm zentrifugiert, die wässrige Phase ausgefroren, die Überstände vereinigt und im Wasserbad bei 65 °C evaporiert wurden. Die Rückstände wurden in 0,5 ml 80 % Methanol aufgenommen und zweimal mit je 2 ml Petroläther entfettet.

Die Petrolätherphase wurde verworfen, die verbleibende Probe 1:3 mit H_2O bidest. verdünnt und einer Kartuschenreinigung über C_{18} -RP-Silikagelkartuschen unterzogen (Waschen der Kartusche mit 2 ml 40 %igem MeOH, Elution mit 1 ml 80 %igem MeOH). Die Eluate wurden abermals evaporiert und in 200 µl 25 %igem Acetonitril aufgenommen.

c) Aufbereitung von Muskelproben aus Injektionsstellen für den HPLC-RIA bzw. HPLC-EIA

Die Injektionsstellen wurden gewogen und anschließend mit Hilfe eines Fleischwolfes zerkleinert, wobei zur Vermeidung einer Kontamination das Gerät jedesmal wieder gereinigt werden mußte. Daraufhin erfolgte eine gründliche Durchmischung. Jeweils 10 g dieser Hackmasse wurden mit je 10 g Phosphatpuffer (67 mM, pH 7,2) versetzt, homogenisiert und anschließend je 2 g Homogenat in Extraktionsgläsern abgewogen. Die Extraktion erfolgte mit 2 x 5 ml Petroläther, der nach Ausfrieren der wässrigen Phase im Wasserbad

evaporiert wurde. Nach Aufnahme in 4 ml 40 %igem MetOH fand eine Kartuschenreinigung über C₁₈-RP-Silikagelkartuschen statt (Elution mit 1 ml 100 %igem MetOH). Die Eluate der veterinärmedizinischen Proben wurden evaporiert und in 1 ml 80 %igem MetOH wieder aufgenommen. Die Eluate der übrigen Proben wurden ebenfalls evaporiert und in 2 ml 40 %igem MetOH rückgelöst.

3. Radioimmuntest für 19-Nortestosteron

Für die radioimmunologische Bestimmung von 19-Nortestosteron wurde das Verfahren von RAPP (Diss., 1986) modifiziert.

Nach Vorlage von 0,5 ml 80 % Methanol wurden die Eichpunkte durch 1:2 Verdünnung der Eichstandard-Lösung (19-Nortestosteron-17a) in Konzentrationen von 2000 pg/50 µl bis 4 pg/50 µl hergestellt.

Das ³H-19-Nortestosteron-17β wurde mit der Antiserumverdünnung ca. 30 Min. vorinkubiert, wobei 0,5 ml Antiserumverdünnung (1:50000 in 0,14 % Albumin-Gelatine-Puffer) die Gesamtaktivität an ³H-19-Nortestosteron-17β (ca. 6000 cpm) enthielt. Die Methanolunverträglichkeit des verwendeten Antiserums wurde dadurch berücksichtigt, daß man eine geringe Menge hochkonzentrierter methanolischer Lösung von ³H-19-Nortestosteron-17β in 0,14 % Albumin-Gelatine-Puffer auf ca. 6000 cpm/0,5 ml verdünnte. Mit Hilfe dieser "heißen" Lösung wurde das Antiserum auf 1:50000 verdünnt.

Für den Testansatz wurden 50 µl der Eichlösungen bzw. der Kartuscheneluate und 0,5 ml des vorinkubierten Gemisches aus ³H-19-Nortestosteron-17β und Antiserum in jedes Reagenzglas pipettiert. Als Kontrollen wurden in jedem Test die Gesamtaktivität (GA; ohne Aktivkohle, mit 50 µl 80 % Methanol als Volumenausgleich) und der Nullwert (ohne 19-Nortestosteron-17β, mit 50 µl 80 % Methanol als Volumenausgleich) mitgeführt. Die unspezifische Bindung (NSB; ohne Antiserum mit 0,5 ml Albumin-Gelatine-Puffer, enthaltend ca. 6000 cpm ³H-19-Nortestosteron-17β als Volumenausgleich) wurde nach Überprüfung seiner Konstanz nur gelegentlich mitbestimmt. Der Test wurde 30 Min. bei 37 °C und danach 2 - 18 Std. bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml eiskalte Aktivkohlesuspen-

sion zugesetzt, 1 Min. geschüttelt und nach einer 10-minütigen Inkubation im Eisbad zentrifugiert (4 °C, 3000 rpm, 10 Min.). Der Überstand wurde in Szintillationsgefäße mit 3 ml Xylofluor^R abgekippt. Nach einer weiteren Inkubation im Wasserbad (15 Min. bei 65 °C) zur Überführung des Steroids von der wässrigen in die organische Phase und anschließendem Schütteln wurden die abgekühlten Küvetten gezählt.

4. Enzymimmuntest für 19-Nortestosteron

a) Entwicklung des Testverfahrens

aa. Gewinnung von 19-Nortestosteronglucuronid mittels einer biotechnischen Methode

Für die spätere Enzymmarkierung des Antigens wurde eine Nortestosteronverbindung benötigt, deren Rest sich für die Kopplung an Enzyme eignete, durch die aber auch das heterologe Prinzip des Enzymimmuntests gewahrt blieb. Nach den Erfahrungen mit Enzymimmuntests für Trenbolon und DES (Meyer und Hoffmann 1987) hat sich das Glucuronid als Brücke bewährt.

Anstelle einer aufwendigen chemischen Synthese sollte versucht werden, die benötigte Östra-4-en-3-on-17 α -yl- β ,D-glucopyranosiduronsäure, im weiteren nur kurz als 19-Nortestosteronglucuronid bezeichnet, über den Stoffwechsel eines Kalbes zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurden einem Kalb (Braunvieh, männl., ca. 100 kg) 900 mg 19-Nortestosteron-17 β , suspendiert in 50 ml Eigenplasma, über die Vena jugularis infundiert. Anschließend wurde über 24 Stunden der Urin des Tieres gesammelt, wobei die einzelnen Portionen sowie der am Vortag entnommene Kontrollurin sofort tiefgefroren wurden.

ab. Reinigung und Identifizierung des Nortestosteron-
glucuronids

Der Arbeitsablauf von Reinigung und Identifizierung des 19-Nor-
testosteronglucuronids wurde wie in Abb. 2 durchgeführt.

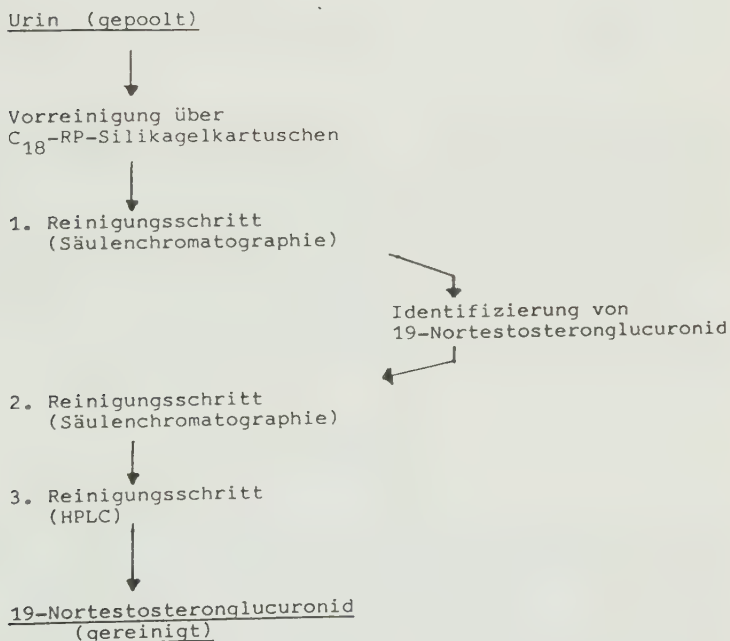


Abb. 2: Übersicht über die Gewinnung von 19-Nortestosteron-
glucuronid

In den einzelnen Urinfraktionen wurde die Gehalte an 19-Nortestosteron radioimmunologisch ermittelt. Die Fraktionen mit den höchsten Gehalten (siehe Abb. 3, Teil III. Ergebnisse) wurden vereinigt (ca. 1060 ml Urin).

Vorreinigung des Urins über C₁₈-Silikagelkartuschen:

Der gepoolte Urin wurde einer Vorreinigung über Kartuschen (SepPak^R C₁₈RP-Silikagelkartuschen) unterzogen: 2 ml 100 % MetOH; 2 x 2 ml Tris-Puffer; 25 ml Urin; 2 ml Tris-Puffer; Elution mit 2 ml 70 % MetOH. Jede Kartusche wurde dabei nach 4-maligem Probenauftrag ausgewechselt.

1. Reinigungsschritt (Säulenchromatographie):

Das gesamte Eluat (ca. 80 ml) aus der Kartuschenvorreinigung wurde im Vakuum auf etwa 10 ml eingengt und danach auf die Säule aufgetragen (Säule: LiChroprep RP-18, 310 x 25 mm, 40 - 63 µm; Laufmittel: 45/55 v/v MetOH/Tris-Acetatpuffer pH 7,2; Fließgeschwindigkeit: 3 ml/min.; Fraktionsgröße: 2 min.; Fraktionsumfang: 0 - 190 min.; Auftragsvolumen: Direktauftrag der Gesamtmenge eingengten Eluats mittels 10 ml Einmal-Spritze). Die Bestimmung der in den Fraktionen enthaltenen 19-Nortestosteronäquivalenten wurde radioimmunologisch durchgeführt.

Identifizierung von 19-Nortestosteronglucuronid:

Durch den 1. Reinigungsschritt (Säulenchromatographie) sind drei verschiedene Substanzen getrennt worden, die sich als breite Peaks darstellten (siehe Abb. 4, Teil III. Ergebnisse).

Zunächst mußte untersucht werden, ob es sich innerhalb der Peaks um jeweils einheitliche Substanzen handelte. Deshalb wurden pro Peak zwei Fraktionen untersucht, die jeweils vom aufsteigenden und absteigenden Schenkel der Peaks ausgewählt wurden (Fraktionen Nr. 70, 78; 90, 106; 146, 160; Nummern = Fraktionierungszeit in Min.). Diese Proben wurde einer HPLC-Passage unterzogen (Säule: Altex^R Ultrasphere ODS 4,6 x 250 mm, 5 µm; Laufmittel: 45/55 MetOH/Tris-Acetatpuffer, pH 7,2; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min.; Auftragsvolumen: 0,5 ml der 1:200 verdünnten Fraktionen). Die Retentionszeiten der Probenpaare wurden mittels UV-Detektion (240 nm) bestimmt und miteinander verglichen.

Als nächstes wurde untersucht, ob es sich bei den Peaks um Verbindungen von 19-Nortestosteron-17a und/oder -17b handelte. Dazu wurden jeweils 5 µl der obengenannten Fraktionen mit 1 ml Acetatpuffer (pH 4,8; 50 mM) und 4 µl Glucuronidase (Helix pom.) 2 Stunden bei 37 °C hydrolysiert. Danach wurden die Referenzsubstanzen und die Hydrolysate (1:200 verdünnt) auf die HPLC aufgetragen (Säule: Glaskartusche LiChrosorb RP-18, 150 x 3 mm, 5 µm Laufmittel: 45/55 v/v Acetonitril/H₂O; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min.; Auftragsvolumen: 0,5 ml; UV-Detektion = 240 nm). Die Retentionszeiten von Referenzsubstanzen und Probenpaaren wurden verglichen.

Steroide werden in konjugierter Form, hauptsächlich als Glucuronide und Sulfate via Urin oder Galle ausgeschieden. Deswegen mußte geklärt werden, bei welchem Substanzpeak es sich um das 19-Nortestosteronglucuronid handelte. Hierzu wurde der Effekt ausgenutzt, daß sich die Retentionszeit einer Verbindung aufgrund einer pH-Wert-Änderung des Laufmittels verschieben kann. Die Fraktionen Nr. 90 und 146 wurden einer erneuten HPLC-Passage im sauren pH-Bereich unterzogen (Säule: Altex Ultrasphere ODS 250 x 4,6 mm, 5 µm; Laufmittel: 50/50 v/v MeOH/Na-Formiatpuffer 50 mM, pH 4,0; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min.; Auftragsvolumen: 0,5 ml der 1:200 verdünnten Fraktionen; UV-Detektion = 240 nm).

Abschließend wurde die Probe Nr. 146 nach Hydrolyse mit Glucuronidase aus E. coli mit der Referenzsubstanz 19-Nortestosteron-17a anhand der Retentionszeiten verglichen (HPLC-System: wie vorhergehendes HPLC-System im sauren pH-Bereich). Damit sollte abgesichert werden, daß es sich bei dem identifizierten Substanzpeak um das 19-Nortestosteronglucuronid und nicht um die unkonjugierte Form, 19-Nortestosteron-17a, handelte.

2. Reinigungsschritt (Säulenchromatographie):

Die Fraktionen 144 - 164 (Angabe in Minuten) aus dem 1. Reinigungsschritt (Säulenchromatographie) wurden nach Abschluß der Identifizierung abermals gepoolt (ca. 120 ml) und im Vakuum auf

ca. 5 ml eingengt. Die folgende Säulenpassage diente einer weiteren Reinigung und Isolierung des 19-Nortestosteronglucuronids (Säule: LiChroprep RP-18, 310 x 25 mm, 40 - 63 μm ; Laufmittel: 47/53 v/v MetOH/Na-Formiatpuffer 50 mM, pH 4,0; Fließgeschwindigkeit: 3 ml/min.; Fraktionsgröße: 2 min.; Fraktionsumfang: 0 - 380 min.; Auftragsvolumen: Direktauftrag der Gesamtmenge eingengten Eluats mittels 10 ml Einmalspritze auf die Säule). Aliquote der Fraktionen Nr. 100 - 244 wurden nach Hydrolyse abermals zur Bestimmung der 19-Nortestosteronkonzentrationen in den Radioimmuntest eingesetzt.

3. Reinigungsschritt (HPLC):

In diesem letzten Reinigungsschritt wurden die noch enthaltenen Formationen entfernt, welche die spätere Kopplung an das Enzym gestört hätten. Die Fraktionen mit den höchsten Glucuronidkonzentrationen aus dem 2. Reinigungsschritt (Säulenchromatographie) wurden vereinigt, der pH-Wert mit 1 N NaOH auf ca. 6,5 eingestellt und das Volumen auf ca. 6 ml im Vakuum eingengt. Danach wurden 3 x 2 ml Konzentrat auf die HPLC aufgetragen (Säule: Altex Ultrasphere ODS 250 x 4,6, 5 μm ; Laufmittel: 30/70 v/v Acetonitril/Triethanolamin-HCl-Puffer 10 mM, pH 7,2; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min.). Der Gehalt an 19-Nortestosteronglucuronid im gesammelten Eluat wurde photometrisch bestimmt. Anschließend wurde das Eluat bei - 30 °C tiefgefroren.

ac. Kopplungen von 19-Nortestosteronglucuronid an alkalische Phosphatase.

Die Kopplungen von 19-Nortestosteronglucuronid an alkalische Phosphatase erfolgten nach dem Prinzip der gemischten Anhydrid-Reaktion (ERLANGER 1957).

Lösung A: 250 μg (1. Kopplung), 100 μg (2. Kopplung) und 50 μg (3. Kopplung) des biotechnisch gewonnenen 19-Nortestosteronglucuronids wurden jeweils mit 20 μl 1 N HCl versetzt, 2 Stunden bei

0.05 Torr gefriergetrocknet, anschließend in 0,5 ml Dimethylformamid aufgenommen und nach Zugabe von 6,25 μ l Methylmorpholin zu erst auf 0 °C und dann auf - 15 °C herabgekühlt.

Lösung B: Einem Gemisch von 850 μ g alkalischer Phosphatase (= 100 μ l gepufferte Lösung) und 400 μ l H₂O wurden tropfenweise 375 μ l Dimethylformamid zugefügt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Reaktion: Lösung A wurde zunächst nach Hinzugabe von 6,25 μ l Isobutyl-Chloroformat 3 min. bei - 15 °C gerührt, bevor Lösung B dazupipetiert wurde. Mit ca. 30 μ l 1 N NaOH wurde nun unverzüglich der pH-Wert auf 8,0 eingestellt, und das Gemisch 1 Stunde bei - 15 °C und 2 Stunden bei 0 °C gerührt. Einer abschließenden Zugabe von 10 mg NaHCO₃ folgte über Nacht eine Dialyse gegen Chromatographie-Puffer und eine Säulenchromatographie (Sephadex G-25 fine; Säule: 1,6 x 50. cm; Fließgeschwindigkeit: 0,75 ml/min. Fraktionsgröße: 4 min.; Fraktionsumfang: 36 Fraktionen). Das so gewonnene und gereinigte Kopplungsprodukt (19-Nortestosteron-glucuronid-alkalische Phosphatase) wurde portioniert und bei - 30 °C eingefroren.

Die Kopplungsprodukte werden im folgenden als "Phosphatase-250" (1. Kopplung), "Phosphatase-100" (2. Kopplung) und "Phosphatase-50" (3. Kopplung) bezeichnet.

ad. Kopplung von 19-Nortestosteronglucuronid an Meerrettich-Peroxidase

Diese Kopplung von 19-Nortestosteronglucuronid an Meerrettich-Peroxidase erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip der gemischten Anhydrid-Reaktion wie oben beschrieben an alkalische Phosphatase. Im Unterschied dazu wurden 500 μ g 19-Nortestosteronglucuronid und 970 μ g Peroxidase (= 100 μ l gepufferte Lösung) eingesetzt.

b) Durchführung des Enzymimmuntests

Bei der Durchführung des Enzymimmuntests wurde die von MEYER & GÜVEN (1986) beschriebene Doppelantikörpertechnik auf Mikrotitrationsplatten angewendet.

ba. Phosphatase-System

Die Löcher einer Mikrotitrationsplatte wurden mit je 1 μg Schaf-IgG/100 μl 1. Coating-Puffer beschichtet (anti-Kaninchen-IgG, gereinigt mittels Affinitätschromatographie, MEYER & HOFFMANN 1987) und über Nacht bei 0 °C inkubiert. Nach dem Abkippen der Lösung wurde jedes Loch vollständig mit Rinderserumalbumin beschichtet (3 mg RSA in 300 μl 2. Coating-Puffer) und weitere 15-45 Min. bei 25 °C inkubiert. Die abgekippte Platte wurde dreimal mit 300 μl EIA-Waschlösung gewaschen. Nun wurden in jedes Reaktionsgefäß 100 μl Enzymverdünnung und 20 μl Eichpunkt bzw. 20 μl biologische Probe pipettiert. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 μl Antiserum-Verdünnung gestartet. Nullwert und NSB wurden mitbestimmt, wobei ein Volumenausgleich mit 20 μl Lösungsmittel (Nullwert) bzw. 100 μl Assaypuffer (NSB) vorgenommen wurde. Die Inkubation für die Immunreaktion dauerte 18 Std. bei 0 °C. Anschließend wurde die Platte viermal mit 300 μl /Loch eiskalter EIA-Waschlösung gewaschen. Nun wurden je 150 μl zimmerwarme Substratlösung pipettiert und ca. 1,5 - 2 Std. unter leichtem Schütteln bei 25 °C inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μl Stoppreagenz beendet und das Ergebnis photometrisch (405 nm) ermittelt.

bb. Peroxidase-System

Die Beschichtung der Mikrotitrationsplatten mit Schaf-IgG sowie mit Rinderserumalbumin erfolgte wie in ba. beschrieben. Die im Test eingesetzten Volumina entsprachen denen für Phosphatase. Die Enzym- und Antiserumverdünnungen wurden in Assaypuffer für Peroxidase vorgenommen. Das Substrat wurde in Substratpuffer für Peroxidase verdünnt. Die Immunreaktion und die Substratreaktion fanden unter Lichtabschluß (Abdeckung der Platten mit Alufolie) statt. Die Farbreaktion wurde nach 40 Minuten mit 50 μl 4 N H_2SO_4 gestoppt und das Ergebnis photometrisch bei 450 nm gemessen.

Antiserum:

Im Enzymimmuntest wurde dasselbe Antiserum gegen 19-Nortestosteron-17 β -hemisuccinat-RSA wie im Radioimmuntest verwendet (NT II; nähere Charakterisierung bei RAPP, Diss. 1986).

Titerbestimmungen:

Zur Ermittlung der optimalen Verdünnungen von enzymmarkiertem Antigen und Antiserum wurde für jedes Kopplungsprodukt eine zweidimensionale Titerbestimmung durchgeführt. Es wurden Enzymverdünnungen von 1:250 bis 1:4000 und Antiserumverdünnungen von 1:10000 bis 1:320000 getestet.

Eichkurven:

Die Eichkurven wurden durch 1:2 Verdünnungen einer Vorratslösung erstellt. Als Standards wurden 19-Nortestosteron-17a und -17 β verwendet.

Standardisierung der Tests:

Um die Tests weitgehend zu standardisieren, wurden Eichvorratslösungen mit 160 ng/200 μ l verdünntem Assaypuffer aliquotiert und bei -30 °C aufbewahrt. Für die Herstellung einer Eichverdünnungsreihe wurden die Portionen mit 800 μ l Methanol aufgefüllt (= 8000 pg/50 μ l für RIA bzw. 3200 pg/20 μ l für EIA). Ebenso wurden die Enzym- und Antikörpervorverdünnungen in größerer Menge hergestellt, portioniert und bei -30 °C tiefgefroren.

c) Präzision und Reproduzierbarkeit der Messungen

Die Präzision des Enzymimmuntests wurde anhand der Wiederfindung definierter Zusätze zu negativen Urinproben ermittelt.

Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Tests wurden die Intra- und Interassayvariationen positiver biologischer Urinproben herangezogen.

d) Validierung der Meßergebnisse des Enzymimmuntests mittels HPLC

Durch die Vorschaltung einer HPLC-Passage sollten weitere störende Blindwerte eliminiert und die zu bestimmende Substanz isoliert werden. Diese Kombination von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Enzymimmuntest sollte der Absicherung der Meßergebnisse dienen.

HPLC-System: Säule: Altex Ultrasphere ODS 250 x 4,6 mm, 5 µm; Auftragsvolumen: 100 µl; Laufmittel: a) 42/58 v/v CH₃CN/Tris-Acetatpuffer 50 mM, pH 7,2; b) 42/58 v/v CH₃CN/Na-Citratpuffer 50 mM, pH 5,0; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min.; Fraktionsgröße: 0,3 min.; Fraktionsumfang: 8 Fraktionen.

Zu Beginn jeder Probenserie wurden die Retentionszeiten von ³H-19-Nortestosteron-17β bzw. von 19-Nortestosteron-17α und -17β bestimmt. Danach richtete sich die anschließende Fraktionssammlung. Die vorbereiteten biologischen Urinproben wurden nach den mitgeführten Referenzsubstanzen sowie nach den negativen und positiven Kontrollproben auf die HPLC aufgetragen.

Die Probenaufarbeitung war so erfolgt, daß die aus den HPLC-Fraktionen entnommenen Aliquots direkt (ohne Verdünnung bzw. Evaporation des Lösungsmittels) in den Enzymimmuntest eingesetzt werden konnten (siehe 2b.). Eine Ausnahme bildete lediglich der EIA im Peroxidase-System, wenn für die HPLC Acetonitril als Laufmittel verwendet worden war. Die Aktivität von Peroxidase wird bereits durch geringe Mengen Cyanid nahezu vollständig gehemmt (SHINDLER et al. 1976). Für den Peroxidase-EIA wurde mit dem sauren Laufmittelgemisch b) gearbeitet. Die HPLC-Fraktionen wurden evaporiert, wobei sich das Cyanid in Form von HCN verflüchtigte. Anschließend wurden die Rückstände in 80 % MeOH aufgenommen. Die Fraktionen konnten nunmehr in den Enzymimmuntest eingesetzt werden.

Die Enzymimmuntests wurden wie unter 4b. beschrieben durchgeführt.

e) Weiterentwicklung der Methodik des Enzymimmuntests

Es wurde versucht, einige Teile des Arbeitsablaufs unter Beibehaltung der Testzuverlässigkeit zu vereinfachen:

Das 2. Coating wurde mit Assaypuffer (0,1 % Albumin) durchgeführt.

Die Tiefkühl-Vorratshaltung der beschichteten Mikrotitrationsplatten wurde modifiziert. Nach der 2. Beschichtung (mit Assaypuffer, 0,1% Albumin) wurden die abgekippten Platten bei -20°C tiefgefroren gelagert. Vor Testbeginn wurden die gefrorenen Platten mit zimmerwarmer EIA-Waschlösung gewaschen und dabei gleichzeitig aufgetaut. Mit dieser Veränderung sollte erreicht werden, daß die Platten schnell und gleichmäßig auftauen. Außerdem sind sie sofort im Test einsetzbar.

Durch den Einsatz eines Mikrotitrationsplatten-Waschgeräts reduzierte sich der Zeitaufwand für den Waschvorgang erheblich. Es wurde allerdings mehr Waschlösung als beim herkömmlichen manuellen Verfahren verbraucht (ca. 500 ml pro Platte). Deshalb wurde die EIA-Waschlösung für den 2. Waschvorgang mit Aqua demineralisata hergestellt, während die Waschlösung für den 1. Waschschrift nach dem 2. Beschichten bzw. für das Auftauen der tiefgefrorenen Platten weiterhin mit Aqua bidest. zubereitet wurde.

5. Trennung verschiedener Steroidverbindungen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

In dieser Untersuchung sollte die Trennleistung der HPLC für 19-Nortestosteron, andere 19-Nor-Steroide sowie andere physiologische und xenobiotische Steroidhormone optimiert werden. Dabei wurde der Einfluß von zwei unterschiedlichen Laufmitteln bei Verwendung einer hochauflösenden C₁₈-Silikagelsäule auf die Retentionszeiten dieser Verbindungen getestet.

Von jeder in Tab. 1 aufgeführten Substanz wurde 1 µg (Trenbolon-17a, -17ß, Trendion, Methyltrienolon nur je 0,2 µg) auf die HPLC aufgetragen. Die Retentionszeiten wurden über UV-Detektion bei 230 nm (bzw. für MPA und Melengestrolacetat bei 260 nm sowie für Trenbolon, Trendion und Methyltrienolon bei 340 nm) bestimmt, weil bei dieser Wellenlänge auch die Östrogene erfaßt werden. Eine Ausnahme bildete das Norethynodrel, das wegen des Fehlens einer konjugierten Doppelbindung kein Absorptionsmaximum im UV-Spektrum besitzt und deshalb nach der HPLC-Passage enzymimmunologisch bestimmt wurde.

HPLC-System: Säule: Altex Ultraspere ODS, 250 x 4,6 mm, 5 µm; Laufmittel: MetOH/Tris-Acetatpuffer 65/35 v/v; Acetonitril/Tris-Acetatpuffer 42/58 v/v; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min.; Auftragsvolumen: 500 µl.

6. Untersuchungen von Anabolikarückständen in Injektionsstellen behandelter Kälber

a) Versuchsanordnungen (illegaler Cocktail)

Tier 1:

Einem männlichen Braunviehkalb (ca. 120 kg) wurden nach Entnahme von Kontrollplasma und Sammlung von Kontrollurin über einen Zeitraum von 83 Tagen 4 intramuskuläre Injektionen eines Hormoncocktails mit folgenden Bestandteilen pro ml gesetzt: Medroxyprogesteronacetat 6 mg; Östradiolbenzoat 18 mg; 19-Nortestosterondeka-

Tab. 1: Liste der Steroidverbindungen

Cortisol	19-Nortestosteron-17 β
Prednisolon	Östron
Flumethason	Östradiol-17 β
Betamethason	Östradiol-17 α
Dexamethason	Testosteron
Triamcinolon	19-Nortestosteron-17 α
Trendion	Norgestrel
19-Norandrostendion	Miboleron
Trenbolon-17 β	Epitestosteron
Trenbolon-17 α	Medroxyprogesteronacetat
Methyltrienolon	Melengestrolacetat
Norethisteron	Progesteron
Norethinodrel	
(keine Absorbtion)	

Weitere 19-Nor-Steroide

Nr. 18795	17 β -Hydroxy-15 β , 16 β -methylen-4 oestren-3-on
Nr. 5244	17 β -Hydroxy-17 α -methyl-4-oestren-3-on
Nr. 32896	17 β -Hydroxy-17 α , 18-dimethyl-4, 15-oestradien-3-on
Nr. 20073	d-17 β -Hydroxy-18-methyl-4-oestren-3-on
Nr. 79658	17 β -Hydroxy-18-methyl-15-methylen-4-oestren-3-on
Nr. 5412	17 α -Ethyl-4-oestren-17 β -ol-3-on
Nr. 57210	17 β -Acetoxy-15 α -methyl-4-oestren-3-on
Nr. 48328	17 β -Acetoxy-15 α , 16 α -methylen-4-oestren-3-on
Nr. 17567	17 β -Acetoxy-15, 16-methylen-4-oestren-3-on
Nr. 70082	17 β -Acetoxy-15 β , 18-dimethyl-4-oestren-3-on
Nr. 21182	17 β -Acetoxy-18-methyl-15 β , 16 β -methylen-4-oestren-3-on
Nr. 71735	17-Propionyloxy-D-homo-4, 16-oestradien-3-on

nat 26 mg. Von dieser öligen Lösung wurden bei den ersten 3 Injektionen (Tage 0, 13 und 20) jeweils 4 ml und bei der vierten (Tag 65) 10 ml eingesetzt. Die Wahl der Injektionsstellen erfolgte nach Gesichtspunkten, die nach der Schlachtung ein leichtes Wiederfinden ermöglichten sollten, und die darüber hinaus eine Kontamination von Injektionsstellen mit höheren Konzentrationen (Injektionen jüngerer Datums) zu Injektionsstellen mit niedrigeren Konzentrationen (Injektionen älteren Datums) ausschließen sollten. Während des Versuchs wurden in unterschiedlichen Zeitabständen Urinproben (bis Tag 71) und Plasmaproben (bis Tag 55) genommen. Am Tag der Schlachtung (83. Versuchstag) wurden die Injektionsstellen sowie eine von den Applikationsorten entfernt gelegene Kontrollmuskelprobe herauspräpariert.

Tier 2:

Nach Gewinnung von Urin- und Blutkontrollproben wurde einem weiblichen Deutsch-Fleckvieh-Kalb (ca. 150 kg) einmalig 4 ml des bei Tier 1 beschriebenen Hormoncocktails intramuskulär (M. gluteus supf.) injiziert. Auch hier wurden bis zur Schlachtung am 20. Tag Blut- und Urinproben (1., 3., 7., 11., 14., 18. Tag) gesammelt. Neben einer Kontrollmuskelprobe und der Injektionsstelle wurde dem Schlachtkörper eine weitere Muskelprobe in unmittelbarer Umgebung (ca. 10 cm) der Injektionsstelle entnommen.

b) Versuchsanordnung (veterinärmedizinische Präparate)

Diese Versuchsreihe wurde vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. mit 12 weiblichen Deutsch-Fleckvieh-Kälbern (Durchschnittsalter 46 Tage) in einem Stall der Landesanstalt für Tierzucht in Grub durchgeführt*). Als Anabolika wurden die drei veterinärmedizinisch zugelassenen Präparate Fortadex^R, Anabolikum^R und Laurabolin^R in öliger Lösung eingesetzt. Den Tieren wurden einmalig 100 mg der 3 genannten Präparate verabreicht (Tab. 2). Jeweils 4 Tiere wurden mit dem gleichen Präparat behandelt, wobei das Medikament jeweils 2 Tieren subkutan und 2 Tieren intramuskulär appliziert wurde. Die nach der Schlachtung am 73. Tag p. appl. entnommenen Injektionsstellen wurden am hiesigen Institut untersucht.

*) An dieser Stelle sei den Herren Dr. Matzke von der Bayer. Landesanstalt für Tierzucht und Dr. Rattenberger vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. für die Zusammenarbeit gedankt.

Tab. 2: Probenidentifizierung

Tier-Nr.	Injektions- mittel	Inhaltsstoff	Applikationsart
13	Fortadex ^R (HYDRO-CHEMIE)	17 β -Hydroxy-4-oestren- 3-on-laurat (25 mg/ml)	i.m.
14	"	"	i.m.
15	"	"	s.c.
16	"	"	s.c.
17	Anabolikum ^R (BELA-PHARM)	17 β -Hydroxy-4-oestren- 3-on-dekanat (25 mg/ml)	i.m.
18	"	"	i.m.
19	"	"	s.c.
20	"	"	s.c.
22	Laurabolin ^R (VEMIE)	17 β -Hydroxy-4-oestren- 3-on-laurat (50 mg/ml)	i.m.
23	"	"	i.m.
24	"	"	s.c.
27	"	"	s.c.

c) Einsatz eines HPLC - Gradientensystems für 19-Nortestosteron-dekanat, Östradiolbenzoat und Medroxyprogesteron-acetat aus Rückständen eines illegalen Hormoncocktails mit anschließendem Enzymimmuntest bzw. Radioimmuntest.

Für bestimmte Trennprobleme kann es notwendig sein, die Zusammensetzung des Elutionsmittels während einer Analyse kontinuierlich zu verändern. Mit Hilfe eines Gradientensystems werden Substanzen mit sehr unterschiedlichen Retentionszeiten erfaßt, wobei einerseits eine gute Trennung innerhalb der Stoffgruppe mit kurzen Retentionszeiten gegeben ist, und andererseits unnötig lange Retentionszeiten von anderen Substanzen verkürzt werden.

Für die Trennung von Medroxyprogesteronacetat, Östradiolbenzoat und 19-Nortestosterondekanat wurde ein Methanol/Wasser - Gemisch verwendet, dessen Methanolanteil wegen der stark unterschiedlichen Lipophilie der Steroidester im Verlauf der Chromatographie erhöht werden mußte.

Folgendes HPLC-System kam zur Anwendung:

Laufmittelgradient: Verhältnis MetOH/Tris-Acetat-Puffer von 60/40 v/v bis 80/20 v/v innerhalb der ersten 10 Min., von 80/20 v/v bis 100/0 v/v innerhalb der folgenden 20 Min..

Säule: LiChroCART RP-18 250 x 4 mm, 5 µm mit Vorsäule LiChroCART RP-18 50 x 4 mm, 5 µm.

Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Probenauftragsvolumen: 500 µl; Fraktionsgröße: 1 Min.; Fraktionsumfang: 1 Fraktion pro Substanz; Temperatur: 25 °C

Sowohl der Ablauf des Gradienten als auch die Fraktionssammlung (MPA von 14,0-15,0, E₂-Benzoat von 25,1-26,1 und 19-NT-Dekanat von 32,3-33,3 Min.) konnten einem Steuergerät einprogrammiert werden. Die Retentionszeiten der Referenzsubstanzen wurden vor dem Auftrag der ersten Probe mittels UV-Detektion (230 nm) ermittelt. Außer den Proben aus den Injektionsstellen wurden eine negative und für jede zu bestimmende Substanz eine positive Muskelprobe als externer Standard mitbestimmt (Zusatz einer definierten Menge Referenzsubstanz zur negativen Muskulatur).

Im Anschluß an die HPLC-Passage wurden die Probeneluate evaporiert und nach Aufnahme in 1 ml 80 %igem MetOH unverdünnt sowie in Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:10000 im Enzymimmuntest bzw. Radioimmuntest eingesetzt.

Enzymimmuntest für 19-Nortestosterondekanat (19-NT-Dekanat)
Der EIA für 19-Nortestosterondekanat erfolgte wie in 4 b) beschrieben. Die Eichkurven wurden über die Kreuzreaktionen zum 19-Nortestosteron-Antikörper mit der 19-Nortestosterondekanat-Standardlösung in 1:2 Verdünnungen und in 80 %igem MetOH erstellt (50 pg - 25,6 ng).

Radioimmuntest für Östradiolbenzoat (E_2 -Benzoat)

Für die Eichkurve wurden in 80 %igem MetOH 1:2 Verdünnungen einer Standardlösung von Östradiol-17 β -benzoat im Bereich von 2000 - 8 pg pro 100 μ l hergestellt. Anschließend wurden im Testansatz (Doppelansatz) 100 μ l Probeneluat bzw. Eichlösung mit 100 μ l 3H -Östradiol-17 β (ca. 10000 cpm) in Reagenzgläsern vermischt. Bei der Gesamtaktivität (GA), der unspezifischen Bindung (NSB) und dem Nullwert (0) wurden entsprechende Volumina mit 80 %igem MetOH ausgeglichen. Nach Evaporation des gesamten Testansatzes im Vakuum wurden die Rückstände von GA und NSB in 1 ml bzw. 0,5 ml Albumin-Gelatine-Puffer, die der Eichpunkte und Proben in 0,5 ml Antiserumverdünnung (1:100000 in Albumin-Gelatine-Puffer) wieder aufgenommen und kräftig geschüttelt. Das Antiserum (gegen 6-Keto-17 β -Östradiol-6-CMO-RSA) zeigt 100 % Affinität zu Östradiol-17 β , dagegen nur 2 % Kreuzreaktion zu Östron und 0,5 % Kreuzreaktion zu Östradiol-17a (SCHALLENBERGER et al. 1985). Die weitere Behandlung des Tests wurde wie in Punkt 3. beschrieben fortgesetzt.

Radioimmuntest für Medroxyprogesteronacetat (MPA)

Der radioimmunologische Nachweis von Medroxyprogesteronacetat in Injektionsstellen erfolgte analog dem Test für Östradiolbenzoat. Die Standardreihe lag im Bereich von 500 - 2 pg/100 μ l 80 %igem MetOH. 100 μ l MetOH enthielten die Gesamtaktivität an 3H -Medroxyprogesteronacetat (ca. 5000 cpm). Die Arbeitsverdünnung des Antiserums (Über die Ziege gewonnener Antikörper gegen MPA-3-Carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin; CORNETTE et al. 1971) von 1:400000 wurde mit Albumin-Gelatine-Puffer hergestellt. Eine eventuell vorhandene Kreuzreaktion des Antiserums gegenüber Melengestrolacetat wurde vorab getestet; sie betrug $< 0,1$ %.

- d) Einsatz eines isokratischen HPLC-Systems für 19-Nortestosterondekanat und -laurat aus Rückständen veterinärmedizinischer Injektionspräparate mit anschließendem Enzymimmuntest.

Die Injektionsstellen, in denen Rückstände von 19-NT-dekanat und -laurat zu erwarten waren, wurden mit Hilfe eines isokratischen

HPLC-Systeme untersucht, da sich die fraglichen Ester nur geringfügig in ihrem aliphatischen Rest unterscheiden (Abb. 1). Aufgrund ihrer starken Lipophilie mußte allerdings ein Elutionsmittel mit hohem Methanolanteil eingesetzt werden (Säule: LiChroCART RP-18, 250 x 4 mm, 5 µm mit Vorsäule LiChroCART RP-18, 50 x 4 mm, 5 µm; Elutionsmittel: Methanol/Tris-Acetat-Puffer 20 mM 95/5 v/v; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Probenauftragsvolumen: 500 µl; Fraktionsgröße: 2 Min.; Fraktionsumfang: 1 Fraktion pro Substanz; Temperatur: 25 °C im zirkulierendem Wasserbad). Für die Fraktionssammlungen (19-NT-dekanat von 11,2-13,2 Min. und 19-NT-laurat von 16,4-18,4 Min.) mußten auch hier vor dem Auftrag der Proben die Retentionszeiten der beiden Referenzsubstanzen über UV-Detektion bei 240 nm ermittelt werden (Abb. 18, Teil III. Ergebnisse). Die Eluate wurden wie in c) evaporiert und in 1 ml 80 % igem MeOH wieder aufgenommen. Zusätzlich wurden eine negative und je eine positive Kontrolle hinzugezogen. Die positive Kontrolle für das 19-NT-dekanat stellte eine schon in c) definierte Injektionsstelle dar. Der positiven Kontrolle für das 19-NT-laurat wurde pro Gramm negativer Muskulatur 1 µg Fortadex^R zugesetzt.

Die Eichkurven im anschließenden Enzymimmuntest lagen für das 19-NT-dekanat im Bereich von 50 pg - 25,6 ng und für das 19-NT-laurat im Bereich von 100 pg - 51,2 ng. Sie wurden ebenfalls in fortlaufenden 1:2 Verdünnungen in 80 % igem MeOH über die Kreuzreaktionen zum 19-Nortestosteron-Antikörper erstellt.

7. Ausscheidung verschiedener parenteral verabreichter 19-Nor-Steroide und deren Bestimmung im Urin von Kälbern

a) Versuchsanordnung

Jeweils 50 mg Norethindron, Norethynodrel und Norgestrel wurden in je 5 ml Erdnußöl gelöst, und jede einzelne Substanz für sich im Abstand von 14 Tagen einem männlichen Braunviehkalb (ca. 100 kg) subcutan appliziert. Urinproben wurden jeweils am selben Tag abends, am Tag 1 morgens und abends und am Tag 2 noch einmal morgens gesammelt. Vor jeder Injektion wurde außerdem Kontrollurin entnommen.

b) Enzymimmunologische Bestimmung von Norethindron, Norethynodrel und Norgestrel im Urin mit vorgeschalteter HPLC

Die Aufarbeitung der Urinproben wurde wie in 2 a) für 19-Nortestosteron beschrieben durchgeführt. Die Kartuscheneluate wurden evaporiert und sofort wieder mit 300 µl 40 %igem MeOH bzw. 25 %igem Acetonitril aufgenommen, bevor sie auf die HPLC aufgetragen werden konnten. Zwei HPLC-Systeme wurden unter Verwendung derselben Proben miteinander verglichen, wobei alle Bedingungen bis auf das Elutionsmittel und die Fraktionierung gleich gehalten wurden.

Methanol-System: Säule: Altex Ultrasphere ODS 250x4,6mm, 5 µm; Laufmittel: 70/30 v/v MeOH/Tris-Acetatpuffer pH 7,2; Auftragsvolumen: 0,1 ml; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Fraktionsgröße: 0,3 min.; Fraktionsumfang: 6,0-15,3 min.; Temp.: 25 °C.

Acetonitril-System: Laufmittel: 42/58 v/v CH₃CN/Tris-Acetatpuffer pH 7,2; Fraktionsumfang: 9,6-18,6 min.

Zusätzlich wurden zwei biologische Urinproben (aus begrenztem Gebiet in Norddeutschland) und die Referenzsubstanzen 19-NT-17a, 19-NT-17b, Norgestrel und Miboleron in beiden Systemen untersucht.

8. Untersuchung von Urinproben Antibiotika-behandelter Kühe im Hinblick auf mögliche Kreuzreaktionen im Nortestosteron-EIA

Die Proben stammten von 3 Tieren aus dem Patientengut eines praktischen Tierarztes. Die Kühe waren am Vortag mit Sulfonamid/Trimethoprim (Borgal^R, 2 Tiere) bzw. mit Chloramphenicol (1 Tier) behandelt worden.

Nachdem die Proben wie üblich aufgearbeitet worden waren, wurden sie mittels Enzymimmuntest für Nortestosteron untersucht.

9. HPLC-EIA für Trenbolon im Muskel

Ziel dieser Untersuchung von Trenbolon-17b in der Muskulatur von Kälbern mittels Enzymimmuntest in Verbindung mit HPLC sollte der

eindeutige Nachweis von 50 pg TBOH-17 β /g Muskulatur sein.
Die Probenaufbereitung erfolgte wie unter 2b. beschrieben.

Die Bestimmung wurde in folgendem HPLC-System durchgeführt:

Säule: LiChroCART RP-18, 250 x 4 mm, 5 μ m; mit Vorsäule

LiChroCART RP-18 50 x 4 mm, 5 μ m

Elutionsmittel: 37/63 v/v Acetonitril/Tris-Acetat-Puffer 50 mM,
pH 7,2;

Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min

Fraktionsgröße: 0,3 min.

Auftragsvolumen: 100 μ l

Temperatur: 25 °C

Die Proben sowie die mitgeführten Kontrollen wurden in der Reihenfolge

- 1) Maschinenleerwert (25 %iges Acetonitril)
- 2) K0₁ (negative Muskelprobe von im Einzelhandel gekauftem Kalbfleisch)
- 3) K0₂ (eine weitere negative Muskelprobe)
- 4) Trenbolon-positive Probe Nr. 1
- 5) Trenbolon-positive Probe Nr. 2
- 6) Trenbolon-positive Probe Nr. 3
- 7) Trenbolon-positive Probe Nr. 4
- 8) K1 (Zusatz von 100 pg TBOH-17 β pro Gramm K0₂)
- 9) K2 (Zusatz von 200 pg TBOH-17 β pro Gramm K0₂)
- 10) K0₂

aufgetragen.

Vor jeder Probenserie wurden 200 ng TBOH-17 β /100 μ l als Referenzsubstanz aufgetragen und die Retentionszeit mittels UV-Detektion (340 nm) ermittelt. Anhand dieser wurde die Fraktionierung der Proben vorgenommen (Fraktionierung von 10,0 - 12,4 min. = 8 Fraktionen).

Danach wurden 100 μ l 25 %iges Acetonitril als Maschinenleerwert aufgetragen. Dieser diente der Erkennung einer eventuellen Kontamination der Probenauftragschleife durch die Referenzsubstanz. Anschließend erfolgte der Auftrag der einzelnen biologischen Proben in der obengenannten Reihenfolge.

Die erhaltenen HPLC-Fractionen konnten ohne weitere Aufarbeitung in den Enzymimmuntest eingesetzt werden. Der EIA wurde wie bei MEYER & HOFFMANN (1987) beschrieben durchgeführt. Als Standardsubstanz für die Herstellung der Eichkurve wurde Trenbolon-17 β verwendet, als Enzym 17 β -Trenbolon-17- β ,D-glucuronid-alkalische Phosphatase.

Die Aufarbeitungsverluste wurden anhand zweier mitgeführter positiver Kontrollen (K1, K2) ermittelt, deren Konzentrationen über Direkttest im EIA bestimmt wurden (sog. externe Standards).

III. Ergebnisse

1. Identifizierung und Gewinnung von 19-Nortestosteronglucuronid

Der Ausscheidungsverlaufs der Nortestosteronmetaboliten im Urin nach intravenöser Injektion von 900 mg 19-NT-178 ist in Abb. 3 dargestellt.

$\mu\text{g/ml}$ Urin

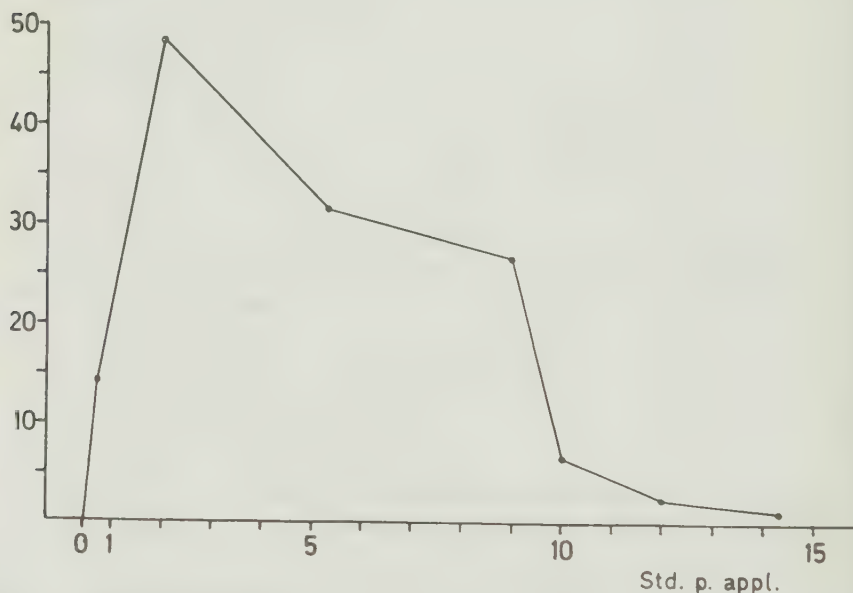


Abb. 3: Ausscheidungsverlauf von 19-Nortestosteron im Urin nach i.v.-Applikation von 900 mg 19-Nortestosteron-178

Durch den 1. Reinigungsschritt (Säulenchromatographie) sind drei verschiedene Substanzen getrennt worden, die sich in Abb. 4 als breite Peaks zeigten. Die weitergehende Untersuchung der Peaks ergab, daß es sich um jeweils einheitliche Substanzen handelte (Tab. 3).

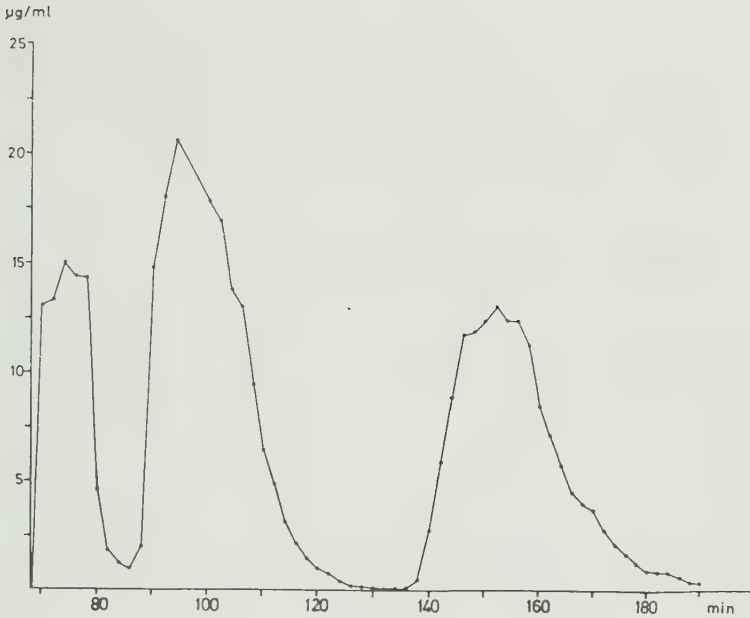


Abb. 4: Auftrennung der Nortestosteronmetaboliten im Urin nach 1. Reinigungsschritt (Säulenchromatographie; LiChroprep- C_{18} -Säule, 45/55 v/v MetOH/Tris-Acetatpuffer)

Tab. 3: Untersuchung der Peaks hinsichtlich der Einheitlichkeit ihrer Substanzen

Peak Nr.	Fraktion Nr.	Retentionszeit (min.)
1	70	10,87
	78	11,00
2	90	16,76
	106	16,65
3	146	24,43
	160	24,62

Nach der Hydrolyse stellte sich im Vergleich zu den Referenzsubstanzen heraus, daß es sich bei den Urinmetaboliten um Konjugate von 19-Nortestosteron-17a und -17ß handelte. Wie aus Tab. 4 zu entnehmen ist, mußte das gesuchte 19-Nortestosteronglucuronid im 2. oder 3. Substanzpeak enthalten sein.

Tab. 4 : Untersuchung der Peaks hinsichtlich des Vorkommens an 19-Nortestosteron-17a bzw. -17ß

			Retentionszeit (min.)
Peak Nr. 1	Fraktion Nr. 70		4,4
	" " 78		4,4
Peak Nr. 2	Fraktion Nr. 90		5,1
	" " 106		5,1
Peak Nr. 3	Fraktion Nr. 146		5,1
	" " 160		5,1
Referenzsubstanz	Nortestosteron-17a		5,1
"	Nortestosteron-17ß		4,4

Der saure pH-Wert eines Elutionsmittels bewirkt, daß sich die Retentionszeit für das Glucuronid verlängert, für das Sulfat jedoch im Vergleich zum neutralen pH-Wert verkürzt. Aus den veränderten Retentionszeiten der Proben 90 und 146 ging hervor, daß es sich bei Peak Nr. 3 um die Glucuronidfraktion handeln mußte (Tab. 5).

Tab. 5 : Vergleich der Retentionszeiten im neutralen und sauren pH-Bereich

		45/55 v/v <u>Laufmittel</u>	50/50 v/v
		MetOH/Tris-Ac.puffer	MetOH/Na-Formiatpuffer
		pH 7,2	pH 4,0
Fraktion Nr. 90	16,8 min.		13,1 min.
" Nr. 146	24,4 "		31,0 "

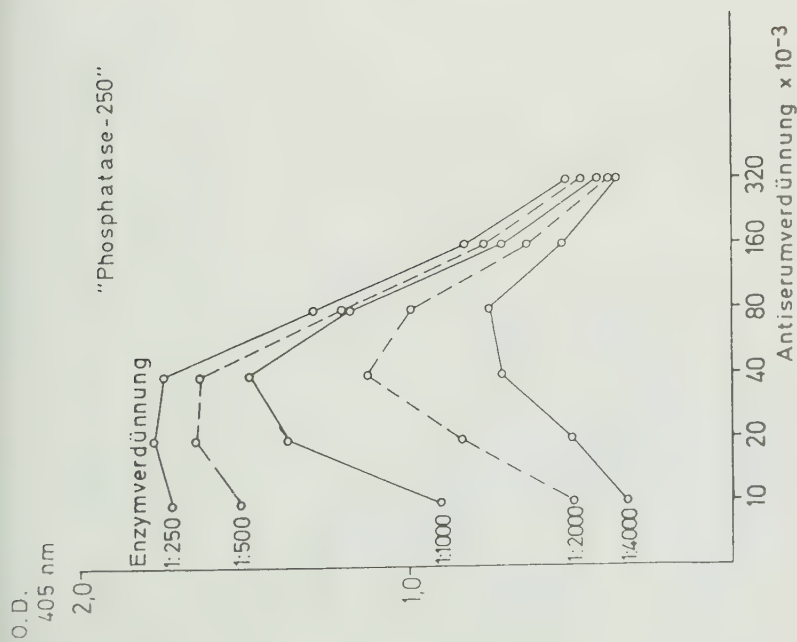


Abb. 5: Zweidimensionale Titerbestimmung 19-NT-EIA (1. Kopplungsprodukt an alkalische Phosphatase)

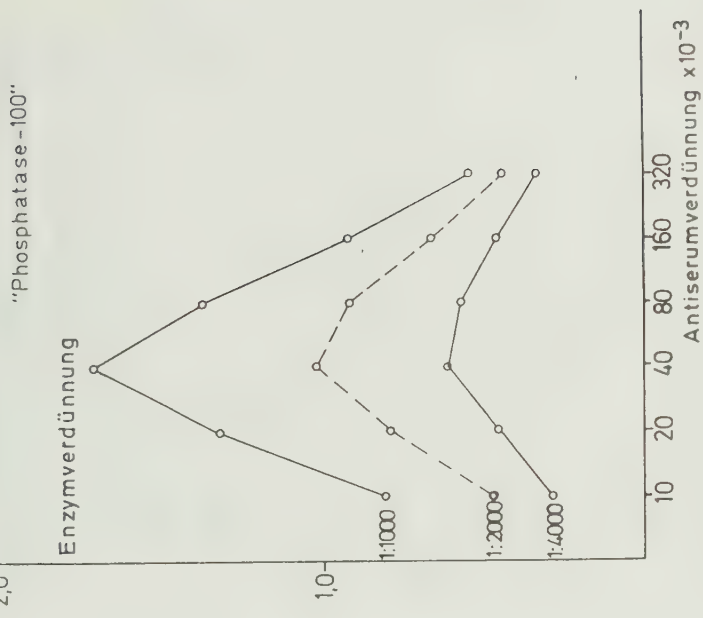


Abb. 6: Zweidimensionale Titerbestimmung 19-NT-EIA (2. Kopplungsprodukt an alkalische Phosphatase)

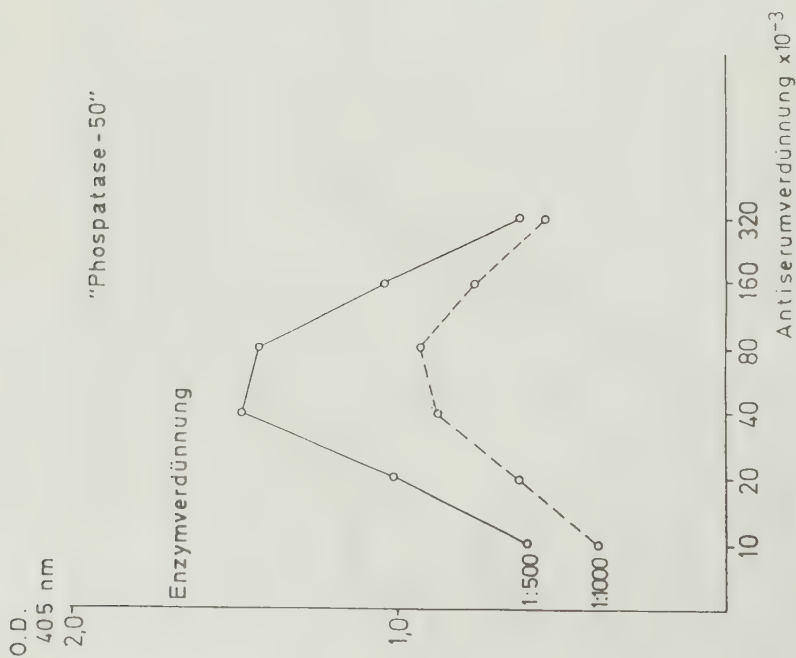


Abb. 7: Zweidimensionale Titerbestimmung 19-NT-EIA (3. Kopplungsprodukt an alkalische Phosphatase)

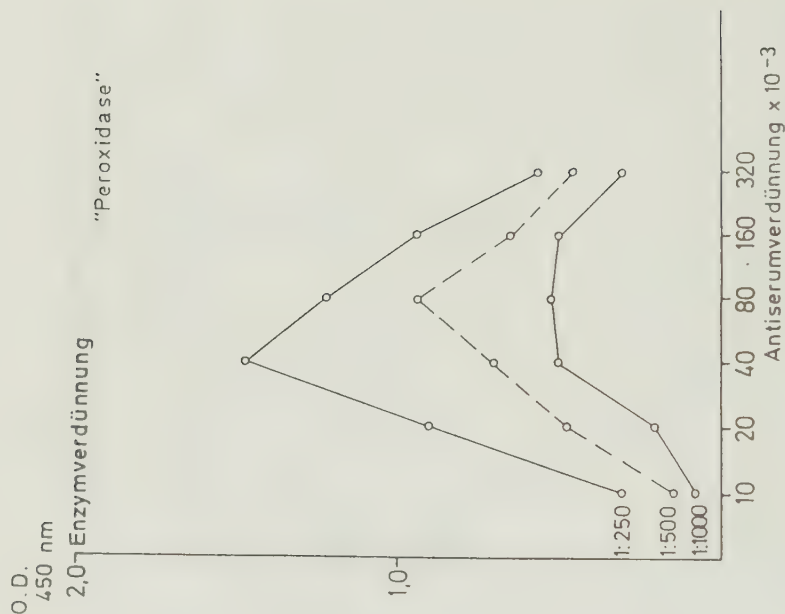


Abb. 8: Zweidimensionale Titerbestimmung 19-NT-EIA (Kopplungsprodukt an Meerrettich-Peroxidase)

Nach erneuter Hydrolyse der Peakfraktion Nr. 146 stimmten die Retentionszeiten von Hydrolysat und Referenzsubstanz 19-Nortestosteron-17a bei 90,0 min. überein.

Die Bilanz der Aufarbeitungsverluste ist aus Tab. 6 zu entnehmen.

Tab. 6 : Bilanz der Aufarbeitungsverluste bei der Reinigung und Gewinnung von 19-Nortestosteronglucuronid

Reinigungsschritt	ml	mg 19-NT-glucuronid	%
Urin gepoolt	1060	38,8*	100
nach 1. Reinigung	120	17,5	45
nach 2. Reinigung	108	14,0	36
nach 3. Reinigung	6,9	9,0	17,7

* Gesamtbestimmung nach Urin-Screeningtest

2. Enzymimmuntest

Titerbestimmungen

Die Ergebnisse der zweidimensionalen Titerbestimmungen sind in Abb. 5 - 8 dargestellt. Anhand der Titerkurven wurde routinemäßig mit folgenden Enzym- und Antiserumverdünnungen gearbeitet:

Phosphatase-System:

1. Kopplungsprodukt ("Phosphatase-250"): Enzym 1:2000
Antiserum 1:160000
2. Kopplungsprodukt ("Phosphatase-100"): Enzym 1:1000
Antiserum 1:160000
3. Kopplungsprodukt ("Phosphatase-50"): Enzym 1:500
Antiserum 1:180000

Peroxidase-System:

- Enzym 1:250
Antiserum 1:160000

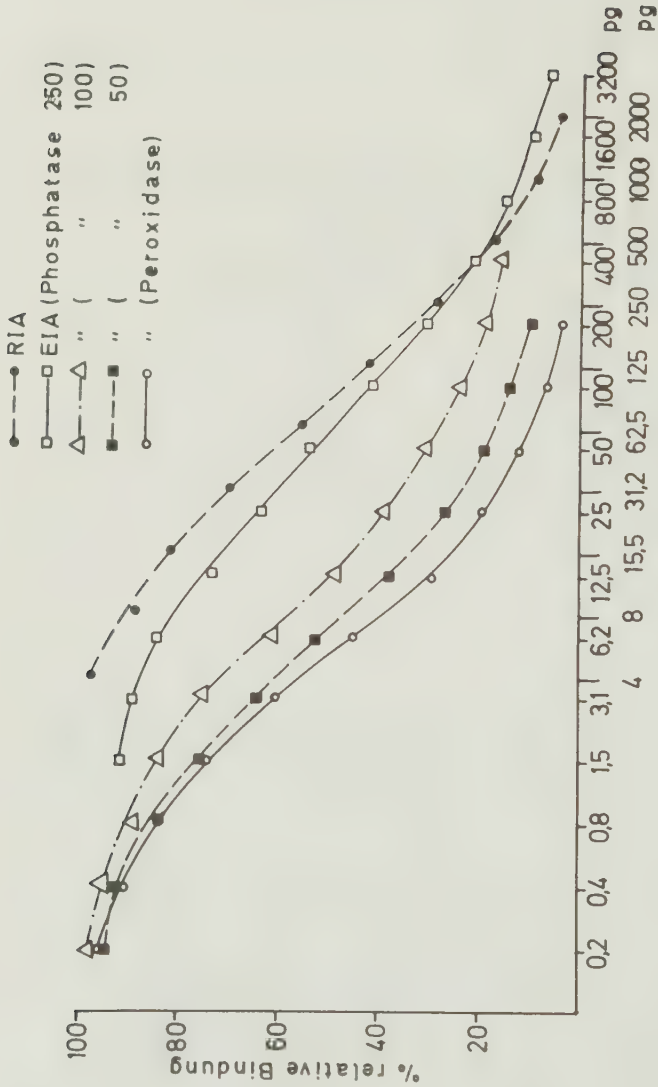


Abb. 9: Vergleich der Eichkurven des Enzymimmuntests (4 Kopplungs-
produkte) mit der des Radioimmuntests
(Eichkurven für 19-NT-17a)

Eichkurven

Beim Vergleich der Eichkurven, die mit den drei Phosphatase-Kopplungsprodukten und dem Peroxidase-Kopplungsprodukt erstellt wurden (Abb. 9) geht hervor, daß der empfindlichste Enzymimmuntest für 19-NT-17a der Peroxidase-Test ist. Die Empfindlichkeit des homologen Radioimmuntests konnte jedoch mit jedem der 4 Enzymimmuntests übertroffen werden. 50 % rel. Bindung liegen im RIA bei ca. 120 pg, im EIA (Phosphatase-250) bei ca. 70 pg, im EIA (Phosphatase-100) bei ca. 13 pg, im EIA (Phosphatase-50) bei ca. 8 pg und im Peroxidase-EIA bei ca. 5 pg. Damit ist der Enzymimmuntest für 19-Nortestosteron-17a um den Faktor 1,7 bis 24 empfindlicher als der Radioimmuntest. Aus dem Eichkurvenvergleich geht weiterhin hervor, daß dasjenige Kopplungsprodukt mit dem niedrigsten Enzym-Hormon-Verhältnis (Phosphatase-50) den sensitivsten Phosphatase-EIA ermöglicht.

Die Kreuzreaktion des Antiserums (NT II, gegen 19-Nortestosteron-17 β -hemisuccinat-RSA) mit 19-NT-17a beträgt im EIA 63 % (Abb.10).

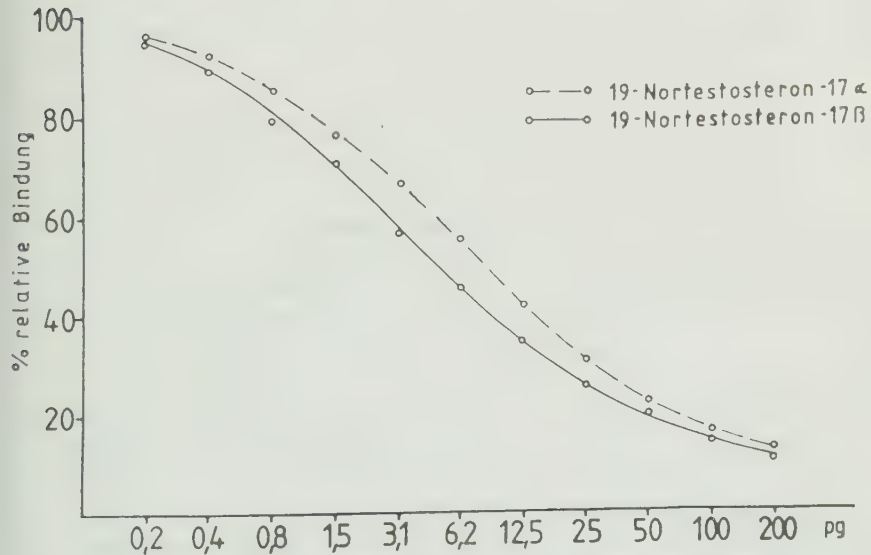


Abb. 10: Kreuzreaktionen des 19-NT-Antiserums (gegen 19-NT-17 β -HS-RSA) mit 19-Nortestosteron-17a; 100 % rel. Bindung bei O.D.₄₀₅ = 0,87

Präzision, Reproduzierbarkeit, Korrelation EIA-RIA

Die Präzision der Enzymimmunttests (Phosphatase-50 und Peroxidase) wurden anhand von definierten Zusätzen zu einer negativen Urinprobe bestimmt. Wie den Tab. 7 und 8 zu entnehmen ist, werden Proben, deren Konzentrationen im mittleren Bereich der Eichkurve liegen, mit großer Genauigkeit bestimmt. Im oberen und unteren Abschnitt der Eichkurve kommt es zu einer mäßigen Über- bzw. Unterbewertung der tatsächlichen Konzentrationen.

Tab. 7 : Wiederfindung von definierten Zusätzen in Urinproben
(Phosphatase-50)

Zusatz (pg 19-NT-17a/Ansatz)	Wiederfindung $\bar{x}$ (pg 19-NT-17B/Ansatz)	S.D.	%	n
320	445	54,4	139	5
800	809	73,6	101	10
5000	3861	141,3	77	5

Tab. 8 : Wiederfindung von definierten Zusätzen in Urinproben
(Peroxidase)

Zusatz (pg 19 NT-17a/Ansatz)	Wiederfindung $\bar{x}$ (pg 19-NT-17B/Ansatz)	S.D.	%	n
400	533	150,0	133	13
1000	1098	158,8	110	12
2000	2281	261,4	114	14
4000	3906	322,7	98	14

Die Reproduzierbarkeit des Enzymimmunttests wurde im Phosphatase-50- und Peroxidase-System durch Ermittlung der Intra- und Inter-assayvariationen getestet (siehe Tab. 9 und 10).

Bei der enzymimmunologischen Bestimmung biologischer Proben wurden 8 Nortestosteron-negative Urinproben untersucht. Die Blindwerte lagen bei Verwendung des Phosphatase-50-Enzyms zwischen 204 und 678 pg/ml.

Bei einer Paralleluntersuchung von 60 Nortestosteron-positiven Urinproben wurde eine Korrelationsberechnung zwischen EIA (Phosphatase-50) und RIA durchgeführt. Sie ergab mit dem Korrelationskoeffizienten $r=0,97$ (Regressionsgerade $y=ax+b$; $a=1,15$; $b=1,9$) eine gute Übereinstimmung zwischen den mittels EIA und RIA bestimmten Urinproben.

Tab. 9 : Intra- und Interassayvariationen der Nortestosteronbestimmung im EIA (Phosphatase-50)

	Interassayvariation (n=5)			Mittlere Intraassayvariation (n=5)		
	(pg/ml)			(pg/ml)		
	$\bar{x}$	S.D.	V.K. (%)	$\bar{x}$	S.D.	V.K. (%)
Anfang Platte	562	79,3	14,1	579	88,1	15,2
Mitte "	636	96,4	15,1			
Ende "	557	72,0	12,9			
Anfang Platte	2315	182,6	7,8	2243	135,1	6,1
Mitte "	2237	47,3	2,1			
Ende "	2239	216,2	9,6			
Anfang Platte	2855	164,4	5,7	2766	168,5	6,1
Mitte "	2791	247,0	8,8			
Ende "	2700	198,7	7,3			
Anfang Platte	3633	200,1	5,5	3278	450,2	13,8
Mitte "	3030	204,6	6,7			
Ende "	3372	58,0	1,7			
Anfang Platte	6619	420,1	6,3	6422	413,4	6,4
Mitte "	5835	255,4	4,3			
Ende "	6527	564,2	8,6			

Tab. 10: Intra- und Interassayvariationen der Nortestosteronbestimmung im EIA (Peroxidase)

	Interassayvariation (n=5)			Mittlere Intraassayvariation (n=7)		
	(pg/ml)			(pg/ml)		
	$\bar{x}$	S.D.	V.K. (%)	$\bar{x}$	S.D.	V.K. (%)
Anfang Platte	480	143,6	29,9	535	111,8	20,9
Mitte "	494	117,9	23,8			
Ende "	579	149,0	25,8			
Anfang Platte	1073	106,0	9,9	1076	158,2	14,7
Mitte "	1097	189,4	17,2			
Ende "	960	120,0	12,5			
Anfang Platte	2094	208,0	9,9	2117	266,7	12,6
Mitte "	2038	83,3	4,0			
Ende "	2181	316,8	14,5			
Anfang Platte	3788	389,5	10,3	3785	306,6	8,1
Mitte "	3999	435,3	10,9			
Ende "	3916	174,5	4,5			

Validierung der Meßergebnisse aus EIA mittels HPLC-EIA

Eine Validierung der enzymimmunologischen Nortestosteronbestimmung im Urin wurde über den HPLC-EIA vorgenommen. Die Berechnung der Konzentrationen in EIA und HPLC-EIA wurde anhand eines externen Standards (Zusatz von ca. 2000 cpm ^3H -19-Nortestosteron zu negativem Kontrollurin, Kartuschenvorreinigung, Messung der verbliebenen Radioaktivität) durchgeführt und betrug 58 %. Wie aus Tab. 11 hervorgeht, werden die Probenblindwerte deutlich reduziert. Die Fraktionierung des HPLC-EIA ist in Abb. 11 dargestellt.

- 1 3-H-19-NT-170
- 2 19-NT-170
- 3 positiver Kontrollurin
- 4 fragliche Urinprobe
- 5 negativer Kontrollurin

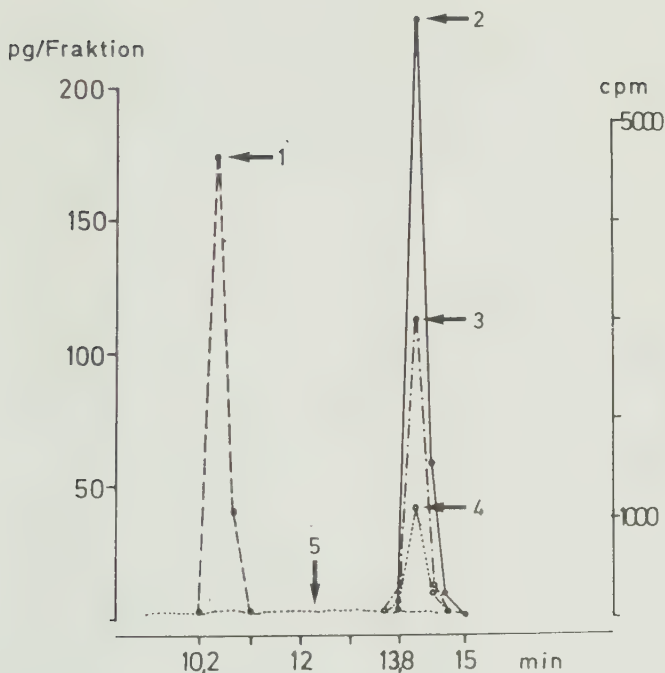


Abb. 11: HPLC/EIA für 19-Nortestosteron (Urin)
(42/58 v/v Acetonitril/Tris-Acetatpuffer)

Tab. 11 : Vergleich der Meßergebnisse von 19-Nortestosteron im
Urin vor und nach HPLC-EIA

Probe	EIA ng/ml	HPLC-EIA ng/ml
neg. Kontrolle	0,4	< 0,1
pos. Kontrolle	3,9	1,5
Probe 1	1,5	0,4
Probe 2	7,8	3,3

Einfluß der veränderten 2. Beschichtung und Vorratshaltung von Mikrotitrationsplatten auf die Empfindlichkeit des Enzymimmuntests ,

Anhand des Eichkurvenvergleichs (Abb. 12) konnte gezeigt werden, daß sich die veränderten Bedingungen (Beschichtung mit Assaypuffer; Tiefkühl-Vorratshaltung nach der 2. Beschichtung; Waschen mit Plattenwaschgerät; 2. Waschschrift mit Aqua demin.) in keiner Weise Auswirkungen auf die Empfindlichkeit des Enzymimmuntests haben. Dadurch konnte die EIA-Methodik weiter vereinfacht werden.

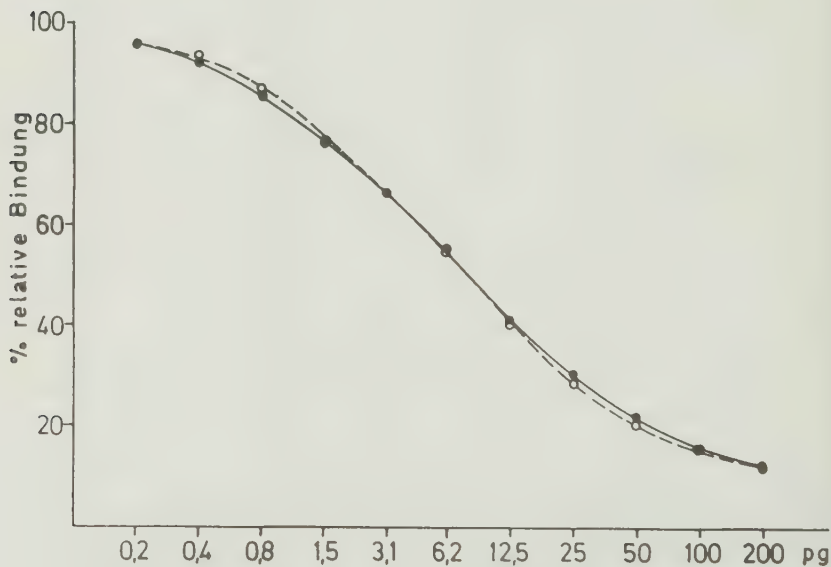


Abb. 12: Vergleich zweier Eichkurven von 19-NT-17a bei unterschiedlicher Vorratshaltung der Mikrotitrationsplatten; 100 % rel. Bindung bei $O.D._{405} = 0,9$

3. Trennung verschiedener Steroidverbindungen mittels HPLC

Die Trennung des 19-Nortestosteron-17 β , -17 α und seiner Metaboliten von anderen 19-Norsteroiden, von physiologischen Östrogenen, Androgenen und Cortisol sowie von diversen xenobiotischen Steroidverbindungen wurde untersucht. Bei Betrachtung der in den Abbildungen 13 - 17 dargestellten HPLC-Diagramme werden Unterschiede im Trennverhalten der HPLC in Abhängigkeit vom Elutionsmittel deutlich. Während im Acetonitrilsystem das 19-NT-17 β von allen untersuchten Steroiden abgetrennt wird, können im Methanolsystem 19-Norandrostendion und 19-NT-17 α isoliert werden. Diese Trennmöglichkeit ist wegen der hohen Kreuzreaktionen des Nortestosteron-Antikörpers zum 19-Norandrostendion von praktischer Bedeutung. Die Corticosteroide werden in beiden Systemen zwischen 4 und 8 Minuten vor den 19-Nor-Steroiden eluiert (Abb. 15). Trenbolon wird ebenfalls vollständig von 19-Nortestosteron und seinen Metaboliten getrennt (Abb. 16). Medroxyprogesteronacetat, Melengestrolacetat und Progesteron werden in beiden Systemen viel später als alle übrigen Verbindungen eluiert (Abb. 17). Die 12 von der Fa. Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellten 19-Nor-Steroide wurden im Methanolsystem untersucht und ließen sich bis auf Nr. 18795 und 5244 von 19-Nortestosteron-17 α und -17 β abtrennen. Die Retentionszeiten beider letztgenannter Substanzen unterschieden sich auch im Acetonitril-System nicht eindeutig von 19-NT-17 α bzw. -17 β . Zusätzlich ist die weitere immunologische Differenzierung wegen der relativ hohen Kreuzreaktionen von 18 bzw. 37 % (siehe Tab. 13) schwierig. Die genauen Retentionszeiten aller untersuchten Verbindungen sind in Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12:

Substanz	Retentionszeiten (min.)	
	mit MeTOH	mit Acetonitril
Cortisol	5.34	5.18
Prednisolon	5.89	4.66
Flumethason	6.47	6.53
Betamethason	7.36	6.53
Dexamethason	7.50	6.53
Triamcinolon	7.61	7.75

Fortsetzung der Tab. 12:

Substanz	Retentionszeiten (min.)	
	mit MeOH	mit Acetonitril
Trendion	8.50	14.26
19-Norandrostendion	9.95	15.03
Trenbolon-17 β	9.00	9.26
Trenbolon-17a	10.00	10.19
Methyltrienolon	10.85	-
Norethisteron	11.60	15.03
Norethinodrel	11.60	15.03
(keine Absorbtion)		
19-Nortestosteron-17 β	12.15	11.35
Östron	12.15	19.61
Östradiol-17 β	12.97	12.83
Östradiol-17a	13.62	15.03
Testosteron	14.72	14.23
19-Nortestosteron-17a	15.99	15.03
Norgestrel	16.90	25.25
Miboleron	17.92	18.03
Epitestosteron	20.95	19.61
Medroxyprogesteronacetat	24.90	> 60.00
Melengestrolacetat	26.74	-
Progesteron	30.37	55.98
19-Nor-Steroide:		
Nr. 18795	12.47	11.30
Nr. 5244	15.72	14.62
Nr. 32896	17.01	-
Nr. 20073	17.63	-
Nr. 79658	18.94	-
Nr. 5412	26.61	-
Nr. 57210	> 30.00	-
Nr. 48328	> 30.00	-
Nr. 17567	> 30.00	-
Nr. 70082	> 30.00	-
Nr. 21182	> 30.00	-
Nr. 71735	> 30.00	-

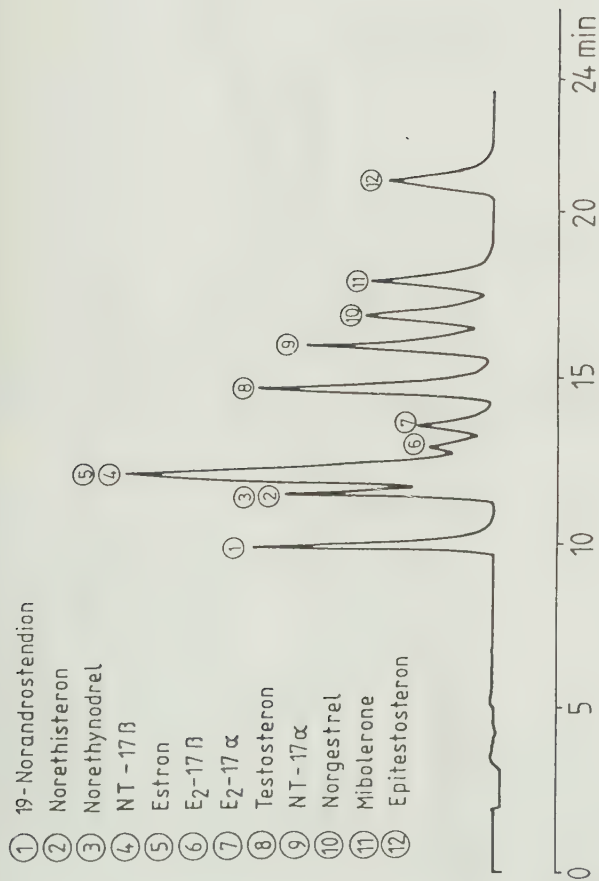


Abb. 13: Auftrennung verschiedener Steroidhormone mittels HPLC
(Methanol-System; UV-Detektion = 230 nm)

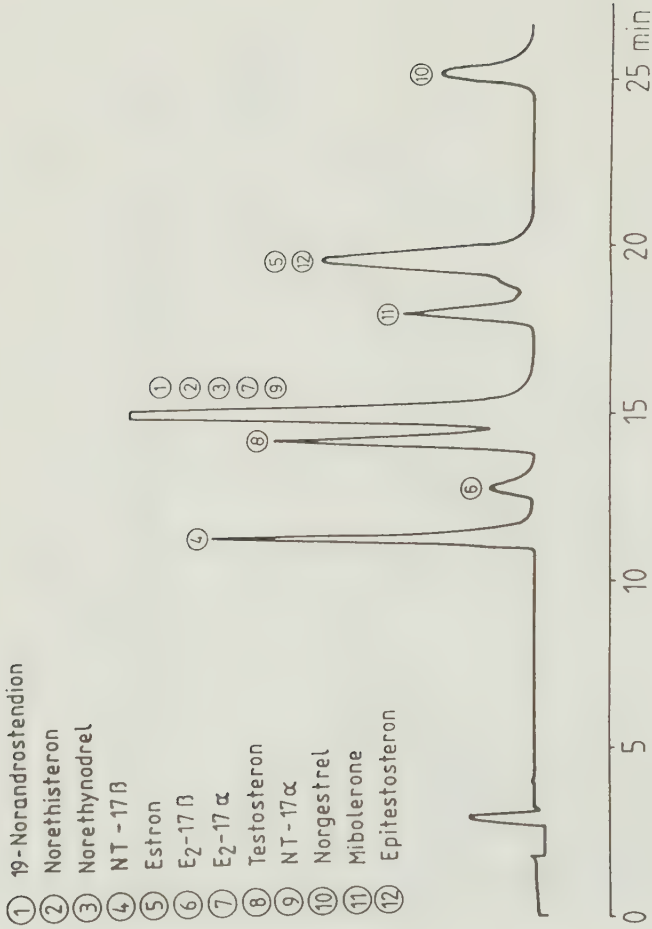


Abb. 14: Auftrennung verschiedener Steroidhormone mittels HPLC
(Acetonitril-System; UV-Detektion = 230 nm)

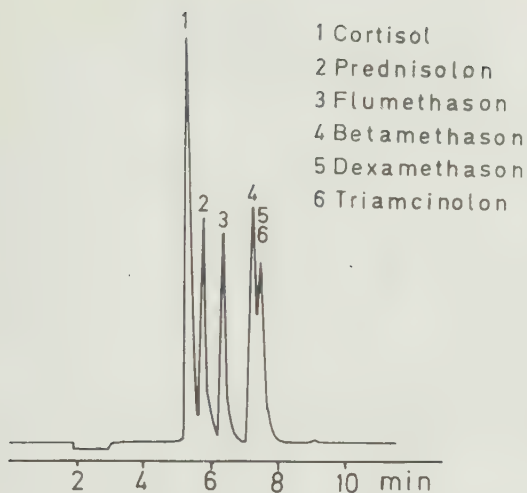


Abb. 15: Auftrennung von Corticosteroiden mittels HPLC
(Methanol-System; UV-Detektion = 240 nm)

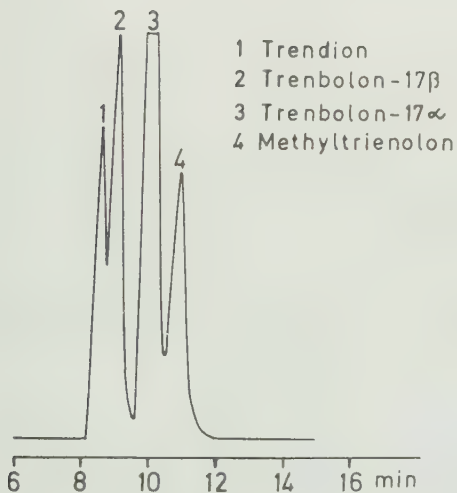


Abb. 16: Auftrennung von Trenbolon, Trendion und Methyltrenbolon
mittels HPLC (Methanol-System; UV-Detektion = 340 nm)

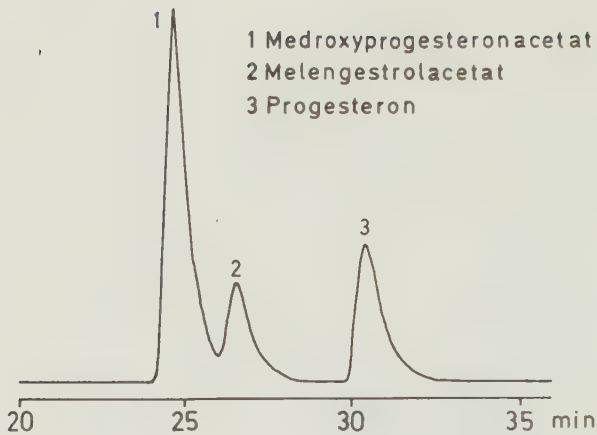


Abb. 17: Auftrennung von MPA, MGA und Progesteron mittels HPLC
(Methanol-System; UV-Detektion = 260 nm)

Tab. 13: Kreuzreaktionen des 19-Nortestosteron-Antiserums mit
weiteren 19-Nor-Steroiden

Präparat	% Kreuzreaktion	Präparat	% Kreuzreaktion
Nr. 18795	18	Nr. 57210	24
Nr. 5244	37	Nr. 48328	71
Nr. 32896	12	Nr. 17567	47
Nr. 20073	59	Nr. 70082	58
Nr. 79658	21	Nr. 21182	14
Nr. 5412	40	Nr. 71735	30

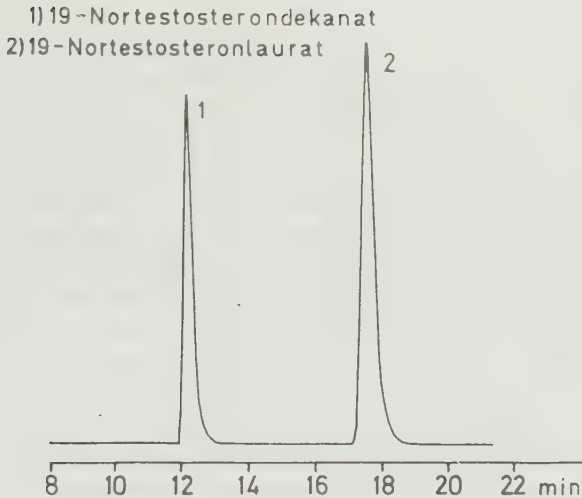


Abb. 18: Auftrennung von 19-NT-dekanat und -laurat mittels HPLC (95/5 v/v MeOH/Tris-Acetatpuffer; UV-Detektion = 240 nm)

4. Injektionsstellen

Alle Injektionsstellen wurden vor der Aufarbeitung einer eingehenden Adspektion unterzogen. Während sich bei den 12 Proben nach Behandlung mit veterinärmedizinischen Präparaten keinerlei Auffälligkeiten wie z.B. Irritationen im Gewebe bzw. an der Oberfläche der Applikationsstelle zeigten, fielen 2 der 5 mit dem illegalen Hormoncocktail behandelten Muskelproben auf. Äußerlich waren die Einstichstellen an kleinen Hämatomen und Nekrosen zu erkennen. Im Zentrum dieser beiden Proben befanden sich ausge dehnte Muskelnekrosen von braun-roter Farbe und sulzig-wässriger Konsistenz. Gesundes Muskelgewebe war kaum noch vorhanden.

Injektionsstellen (veterinärmedizinische Präparate)

In Abb. 18 ist der Verlauf der isokratischen HPLC-Passage der Referenzsubstanzen 19-NT-dekanat und -laurat dargestellt.

In Tab. 14 sind die Ergebnisse aus den Injektionsstellen zusammengefaßt. Die höchsten Rückstände wurden nach Applikation des Präparates Laurabolin^R ermittelt: von 100 mg NT-laurat waren nach 73 Tagen Wartezeit noch max. 16 mg im Muskel vorhanden. Nach der Fortadex^R-Applikation waren noch bis zu 1,75 mg NT-laurat nachweisbar. Dagegen konnten nach dieser langen Wartezeit keine aus der Anabolicum^R-Behandlung stammenden Rückstände mehr ermittelt werden. Da jedoch eine genaue Abgrenzung der Injektionsstellen durch adspektorisch auffällige Merkmale nicht möglich war, könnten die Gesamtrückstände möglicherweise höher gewesen sein.

Tab. 14: Rückstände in den Injektionsstellen (vet.med. Präparate)

Tier Nr.	Injektion von	Gesamtgewicht d. Inj.stelle	µg/g Gewebe	mg/Gesamt- inj.stelle
K0	-	-	< 0,025	-
K1 (Dekanat)	-	-	0,75	-
K1 (Laurat)	-	-	1,0	-
13	NT-laurat*	253	< 0,025	< 0,007
14	"	263	< 0,025	< 0,007
15	"	345	< 0,025	< 0,009
16	"	220	8,0	1,76
17	NT-dekanat**	306	< 0,025	< 0,008
18	"	182	< 0,025	< 0,005
19	"	231	< 0,025	< 0,006
20	"	291	< 0,025	< 0,008
22	NT-laurat***	190	< 0,025	< 0,005
23	"	186	85,0	15,8
24	"	263	33,0	8,7
27	"	277	3,4	0,94

(<=Nachweisgrenze; Wiederfindung=40 %; alle Werte hochgerechnet.)

*: Fortadex^R; **: Anabolicum^R; ***: Laurabolin^R

Injektionsstellen (illegaler Cocktail)

Der qualitative Nachweis von MPA, Östradiolbenzoat und 19-NT-dekanat in Injektionsstellen behandelter Kälber konnte mit der Kombination HPLC und UV-Detektion geführt werden (Abb. 19 - 22). Die Retentionszeiten der Substanzpeaks in den Injektionsstellen (Abb. 21) waren mit denen des Hormoncocktails (Abb. 20) und mit den Referenzsubstanzen (Abb. 19) identisch. Bei den beiden zusätzlichen Substanzen, die im UV-Diagramm der Injektionsstelle darstellbar sind, handelt es sich um physiologische Stoffe, wie sie ebenfalls bei der Kontrollprobe zu finden waren (Abb. 22).

Die Ergebnisse aus diesen Injektionsversuchen sind den Tab. 15 - 17 zu entnehmen. Bei den Injektionen von je 24 mg MPA lagen nach 20 Tagen bereits alle Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Nur nach Verabreichung der 2,5fachen Dosis ließen sich nach 18 Tagen noch 0,63 mg pro Gesamtinjektionsstelle messen. Östradiolbenzoat wird dagegen langsamer abgebaut. Von ursprünglich 72 mg waren nach 20 Tagen noch 1,3 mg und nach 63 Tagen noch 0,3 mg vorhanden. Die Erhöhung der verabreichten Dosis um den Faktor 2,5 beeinflusst die Abbaugeschwindigkeit anscheinend kaum. Die Injektionsdosis von 104 mg NT-dekanat wird innerhalb von 20 Tagen zu etwa 80 % abgebaut. Von 260 mg NT-dekanat sind nach 18 Tagen nur noch 13 % wiederzufinden.

Tab. 15: Gesamtgewichte des Bereichs der Injektionsstellen
(illegaler Cocktail)

Probe 1: K _O Tier II	55 g
Probe 2: Tier II Injektionsstelle	620 g
Probe 3: Tier II Injektionsstelle (10 cm Umgebung)	735 g
Probe 4: K _O Tier I	256 g
Probe 5: 1. Injektionsstelle Tier I	250 g
Probe 6: 2. Injektionsstelle Tier I	750 g
Probe 7: 3. Injektionsstelle Tier I	305 g
Probe 8: 4. Injektionsstelle Tier I	540 g

Tab. 16: Rückstände in Injektionsstellen ($\mu\text{g/g}$ Muskulatur)

Probe	Injektion	MPA	E ₂ -Benzoat (in $\mu\text{g/g}$ Muskulatur)	NT-Dekanat
1	--	< 0,03	< 0,08	< 0,10
2	4 ml	< 0,03	2,15	3,80
3	4 ml	< 0,03	0,78	1,46
4	--	< 0,03	< 0,08	< 0,10
5	4 ml	< 0,03	0,12	0,12
6	4 ml	< 0,03	< 0,08	0,16
7	4 ml	< 0,03	1,05	0,20
8	10 ml	1,17	5,42	6,10

Tab. 17: Rückstände in Injektionsstellen (mg/Injektionsstelle)

Probe	Injektion	Wartezeit (Tage)	MPA	E ₂ -Benzoat (in mg/Injektionsstelle)	NT-Dekanat
2	4 ml	20	< 0,019	1,33	2,36
3	4 ml	20	< 0,022	0,57	1,07
5	4 ml	83	< 0,007	0,03	0,03
6	4 ml	70	< 0,022	< 0,06	0,12
7	4 ml	63	< 0,009	0,32	0,06
8	10 ml	18	0,63	2,90	3,30

Referenzsubstanzen:

- 1 Medroxyprogesteronacetat
- 2 Östradiolbenzoat
- 3 19-Nortestosterondekanat

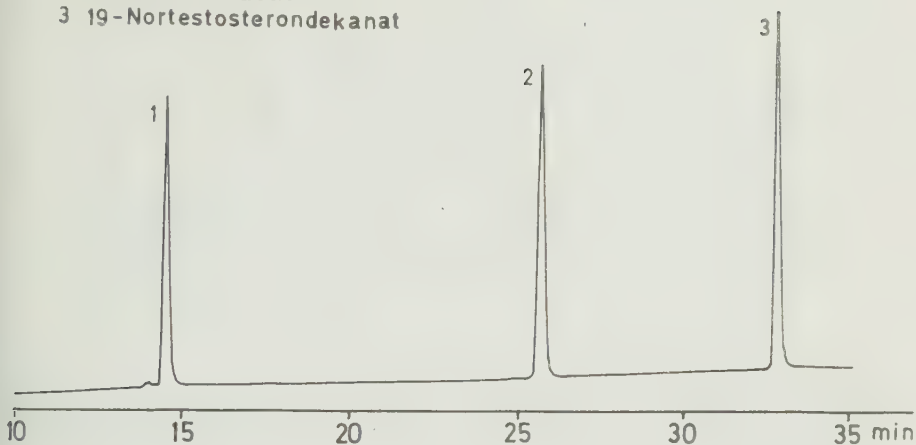


Abb. 19: Auftrennung von MPA, Östradiolbenzoat und 19-NT-dekanat
mittels HPLC (Gradientensystem 60-100 % MeOH;
UV-Detektion = 230 nm)

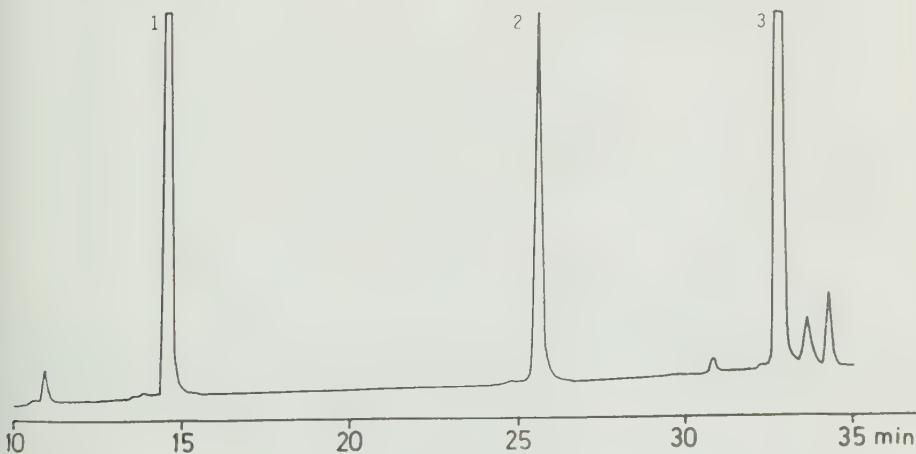
Hormoncocktail

Abb. 20: Auftrennung von MPA, Östradiolbenzoat und 19-NT-dekanat
aus Hormoncocktail mittels HPLC
(Gradientensystem 60-100 % MeOH; UV-Detektion = 230 nm)

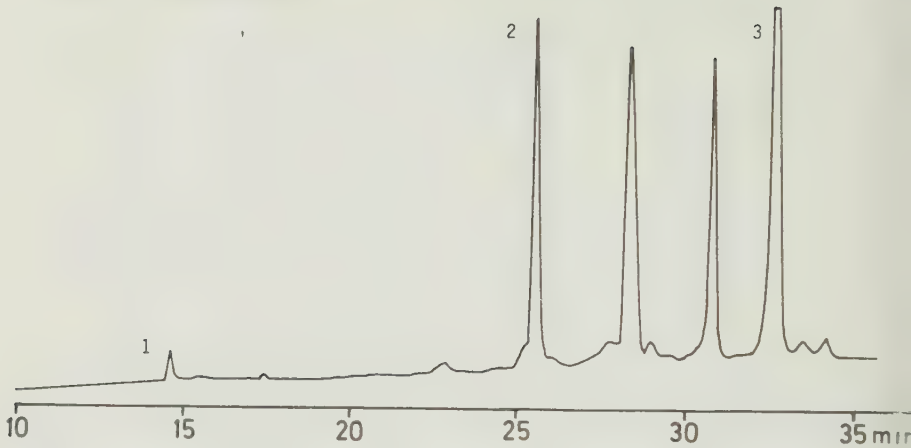
Kalb Injektionsstelle

Abb. 21: Auftrennung von MPA, Östradiolbenzoat und 19-NT-dekanat aus Injektionsstelle nach Verabreichung eines illegalen Hormoncocktails mittels HPLC
(Gradientensystem 60-100 % MetOH; UV-Detektion = 230 nm)

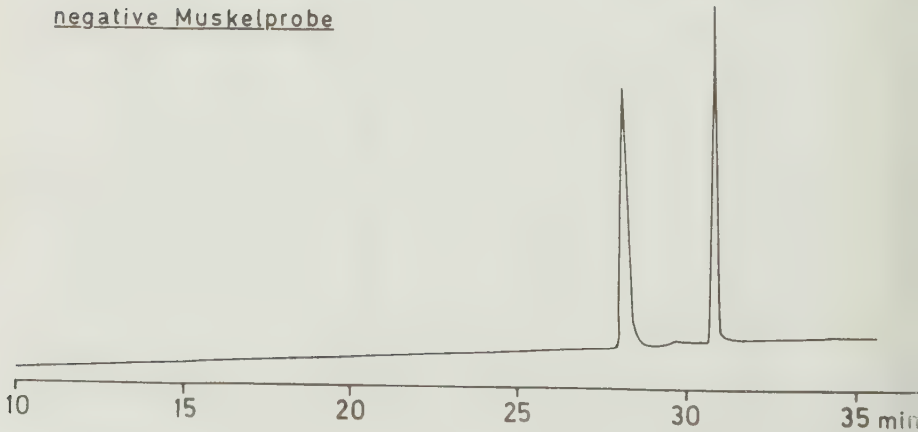
negative Muskelprobe

Abb. 22: HPLC-Diagramm einer negativen Muskelprobe
(Gradientensystem 60-100 % MetOH; UV-Detektion = 230 nm)

Parallel zu den Injektionsversuchen an Tier I und II wurde der Ausscheidungsverlauf von 19-Nortestosteron im Urin und Plasma untersucht. Jeweils 2-4 Tage nach einer Injektion ist ein zweigipfliger Anstieg der Nortestosteronkonzentrationen zu beobachten (Abb. 23). Es werden Maximalwerte von 140 ng/ml Urin erreicht. Nach der 3. Injektion (Tier I) gehen die Werte vom Ausscheidungs-gipfel innerhalb von 4 Tagen auf Werte um 30-40 ng/ml zurück. Danach sinkt der Urinspiegel innerhalb von 35 Tagen kontinuierlich langsam weiter bis auf ca. 2 ng/ml. Die NT-Konzentrationen im Plasma zeigen dagegen einen eingipfligen Anstieg bis auf Höchstwerte von 3,5 ng/ml und fallen nach der letzten Injektion langsam und kontinuierlich auf 150 - 200 pg/ml ab (Abb. 24).

5. Ausscheidung von Norethisteron, Norethynodrel und Norgestrel über den Urin beim Kalb und deren Bestimmung im HPLC-EIA

Die enzymimmunologische Bestimmung der drei 19-Nor-Steroide wurde über Kreuzreaktionen des NT-Antiserums (Norethisteron: 74 %; Norethynodrel: 5 %; Norgestrel: 6 %; siehe Abb. 25) durchgeführt. Die Fraktionierung des HPLC-Eluats wurde hinreichend klein vorgenommen, um dem Überschneiden von kurz aufeinanderfolgenden Peaks vorzubeugen bzw. um die Selektivität der HPLC vollständig auszunutzen. Wie die Abb. 26 - 29 zeigen, werden auch in diesem Versuch die Trenneigenschaften einer hochauflösenden Säule wesentlich vom verwendeten Elutionsmittel bestimmt. Im Acetonitril-System erscheinen Norethisteron, Norethynodrel und deren vermutete Metaboliten in der Position des 19-Nortestosteron-17a. Dagegen wurden bei beiden Substanzen im Methanolsystem drei weitere Metaboliten vom Nortestosteron-17a abgetrennt. Bei den beiden fraglichen Urinproben wurde ebenfalls eine bessere Peakdifferenzierung im Methanolsystem erreicht. Während bei Probe 1 Nortestosteron-17a und -17b und bei Probe 2 Nortestosteron-17b identifiziert wurden, konnte die Natur der weiteren Metaboliten nicht geklärt werden. Norgestrel konnte in diesem Versuch nach einmaliger Applikation nicht mehr nachgewiesen werden.

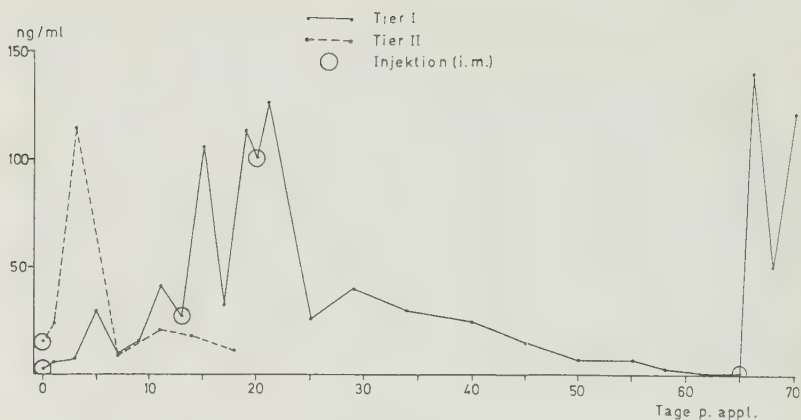


Abb. 23: Ausscheidungsverlauf von 19-Nortestosteron im Urin nach mehrmaliger i.m.-Applikation eines illegalen Hormoncocktails

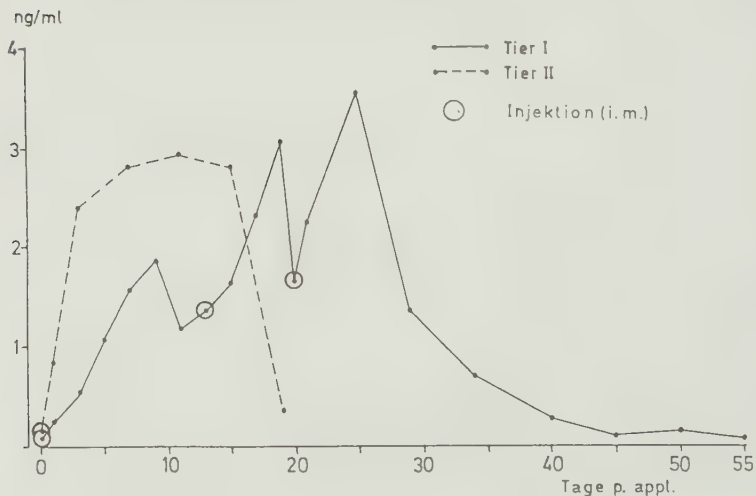


Abb. 24: Plasmaspiegel von 19-Nortestosteron nach mehrmaliger i.m. Applikation eines illegalen Hormoncocktails

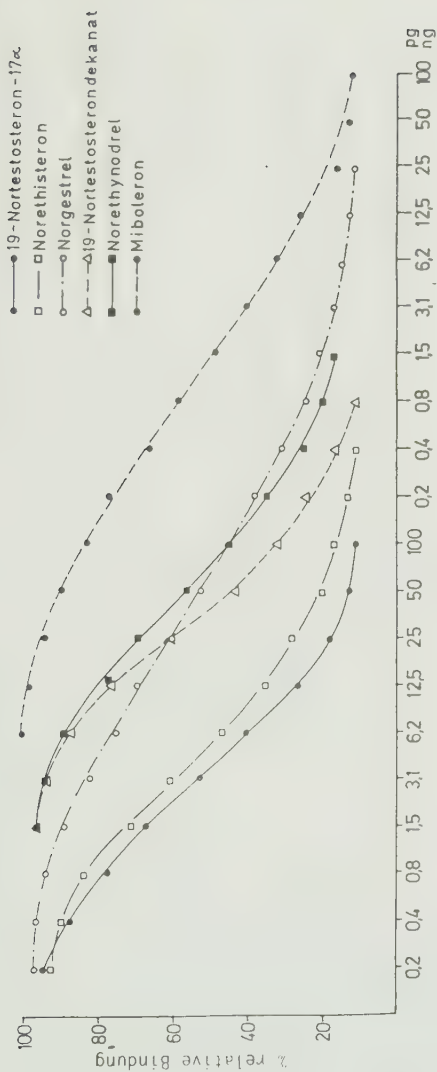


Abb. 25: Kreuzreaktionen des 19-Nortestosteron-Antiserums (gegen 19-NT-17β-hemisuccinat-RSA) mit anderen 19-Nor-Steroiden

Referenzsubstanzen:

- 1 ^3H -19-NT-17 β
- 2 19-NT-17 α
- 3 ^3H -Miboleron
- 4 Norgestrel

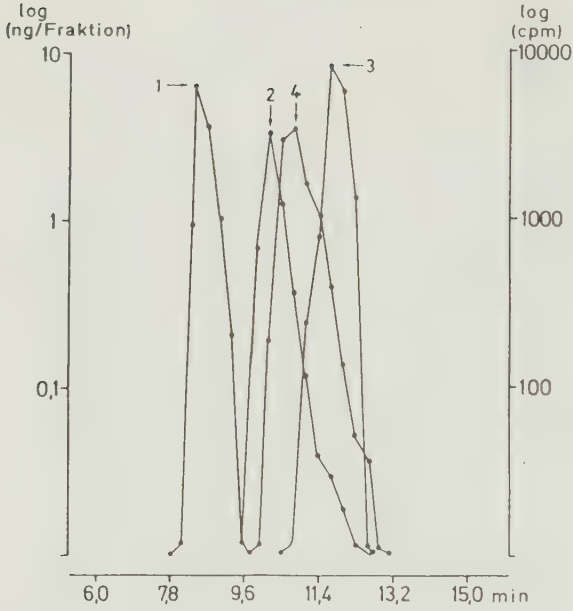


Abb. 26: HPLC/EIA von ^3H -19-NT-17 β , 19-NT-17 α , Norgestrel und ^3H -Miboleron (70/30 v/v Methanol/Tris-Acetatpuffer)

Urinproben:

- Norethisteron
- - - Norethynodrel
- fragliche Probe

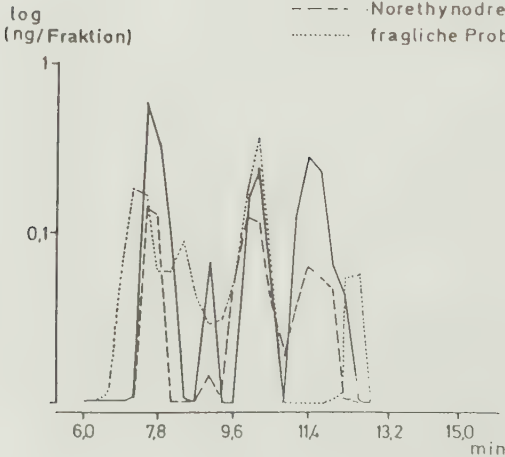


Abb. 27: Ausscheidung von Norethisteron und Norethynodrel im Urin und deren Bestimmung im HPLC/EIA (70/30 v/v Methanol/Tris-Ac.P.)

Referenzsubstanzen:

- 1 ^3H -19-NT-17 β
- 2 19-NT-17 α
- 3 ^3H -Miboleron
- 4 Norgestrel

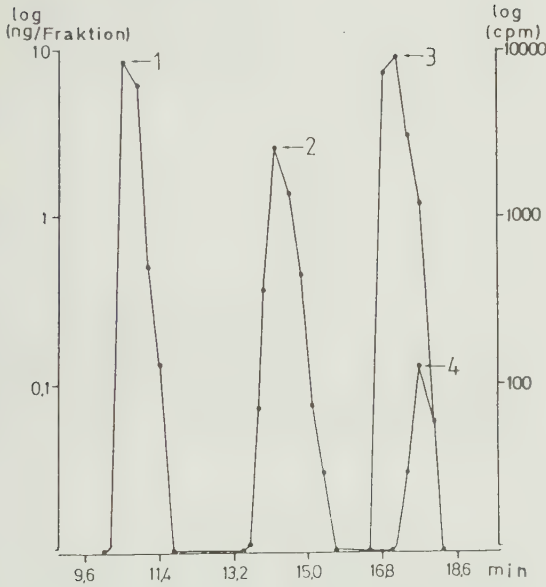


Abb. 28: HPLC/EIA von ^3H -19-NT-17 β , 19-NT-17 α , Norgestrel und ^3H -Miboleron (42/58 v/v Acetonitril/Tris-Acetatpuffer)

Urinproben:

log (ng/Fraktion)

- Norethisteron
- - - Norethynodrel
- fragliche Probe

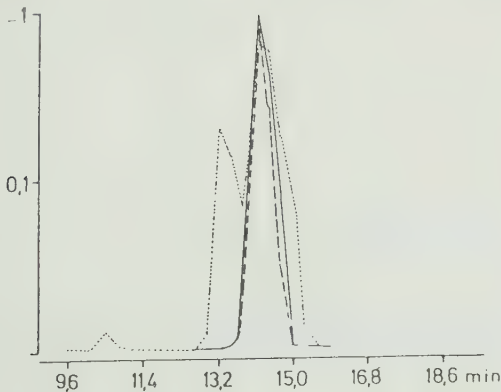


Abb. 29: Ausscheidung von Norethisteron und Norethynodrel im Urin und deren Bestimmung im HPLC/EIA (42/58 v/v Acetonitril/Tris-Ac.P.)

6. Untersuchung von Urinproben Antibiotika-behandelter Kühe im Hinblick auf mögliche Kreuzreaktionen im Enzymimmuntest

Die Untersuchung von 4 Urinproben Antibiotika-behandelter Kühe (siehe S. 37) mittels Nortestosteron-EIA verlief negativ. Die Konzentrationen lagen zwischen 298 und 435 pg/ml Urin und damit im Bereich der Blindwerte beim Kalb.

7. HPLC-EIA für Trenbolon in Muskulatur

Ziel war es, einen Test auszuarbeiten, bei dem die Probenaufarbeitung, die Probenauftragsmenge und die Fraktionsgröße so aufeinander abgestimmt sein sollten, daß die den HPLC-Fraktionen entnommenen Aliquots unmittelbar in den Enzymimmuntest eingesetzt und 50 pg Trenbolon/g Muskulatur eindeutig nachgewiesen werden konnten.

Der HPLC-EIA wurde mit 4 Muskelproben durchgeführt, deren Trenbolonkonzentrationen vorab im EIA bestimmt wurden und zwischen 60 und 130 pg/g lagen. Nach der Bestimmung im HPLC-EIA wurden Konzentrationen von 50 bis 100 pg/g gemessen. Die Wiederfindung betrug 45 %. In Tab. 18 ist die genaue Berechnung unter Einbeziehung der wichtigsten Faktoren einschließlich der Wiederfindung aufgelistet. Abb. 30 zeigt die graphische Darstellung des HPLC/EIA.

Bei Ausgangskonzentrationen von 50 - 100 pg/g Muskulatur gelangt man nach diesem vorgestellten Arbeitsgang mit Konzentrationen von 0,4 - 4 pg/20 µl HPLC-Eluat in den steilen Bereich der Eichkurve (50 % rel. Bindung bei ca. 2,5 pg).

Tab. 18: Detaillierte Aufrechnung der TBOH-Konzentrationen im
HPLC-EIA

Berechnungsfaktor/ Aufarbeitungsgang	Konzentration in Proben (pg)			
	1	2	3	4
TBOH/20 µl HPLC-Eluat (Frakt. 4-6)				
Frakt. 4:	1,3	1,5	0,9	0,7
Frakt. 5:	4,0	3,0	3,8	1,9
Frakt. 6:	0,7	0,5	0,7	0,4
3 HPLC-Fraktion à 300 µl (x15) (Fraktionen 4 - 6)	90	75	82	45
100 µl Probenauftrag auf HPLC				
von 200 µl Kart.eluat (x2)	180	150	164	90
Wiederfindung (45%)	400	335	363	201
Umrechnung auf 1 g Muskel (:4)	100	83	91	50

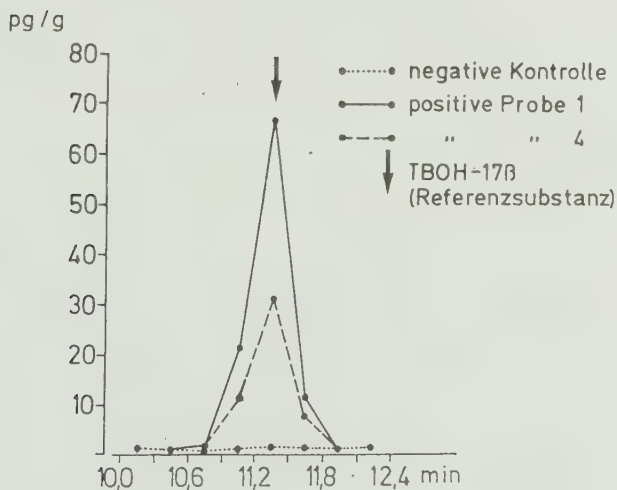


Abb. 30: HPLC/EIA für TBOH-17β (Muskel) (37/63 v/v CH₃CN/Tris-Acetatpuffer);
Referenzsubstanz mittels UV-Detektion (340 nm) bestimmt

IV. Diskussion

Für die Rückstandsanalytik haben sich die immunologischen Methoden wegen ihrer Empfindlichkeit, Spezifität und Praktikabilität bewährt. Der Radioimmuntest ist heute das Routineverfahren der Wahl. Allerdings sind nur relativ wenige Labors in der Lage und befugt, Tests mit Radioisotopen durchzuführen. Im Rahmen einer effektiven Kontrolle sollten aber auch Labors mit konventioneller Ausstattung in der Lage sein, Routineuntersuchungen durchführen zu können. Der Enzymimmuntest stellt eine Alternative zum RIA dar, weil sich mit ihm Tests von vergleichbarer Spezifität und Sensitivität bei wesentlich geringerem Kostenaufwand für Materialien und Geräte durchführen lassen.

Mit dem Enzymimmuntest für 19-Nortestosteron können ebenfalls Bestimmungen im ppt-Bereich durchgeführt werden. Im Vergleich zum homologen RIA ist die Empfindlichkeit der Eichkurve im Phosphatase-System je nach Kopplungsprodukt zwischen 1,7 bis 20 mal und im Peroxidase-System sogar 24 mal höher (bezogen auf 50 % rel. Bindung). Inzwischen konnte ein heterologer RIA etabliert werden (VOGT 1987), der eine Empfindlichkeit von 15 pg bei 50 % relativer Bindung aufweist. Diese beruht auf der höheren spezifischen Aktivität des mit dem 19-Nortestosteron-Antikörper kreuzreagierenden ^3H -Methyltrienolon von 86 Ci / mmol.

Die Testempfindlichkeit des EIA hängt wesentlich von einem niedrigen molaren Enzym-Hormonverhältnis im Kopplungsprodukt ab. Die Kopplung von Hormon an Enzym erfolgt über freie Lysinreste, wovon die alkalische Phosphatase ca. 42 (PORTMANN et al. 1982), die Meerrettich-Peroxidase nur 5-6 besitzt (AIBARA et al. 1982). Deshalb ist es schwieriger, ein optimales Kopplungsprodukt mit Phosphatase als mit Peroxidase zu herzustellen. Anhand dieser Gegebenheiten lassen sich sowohl die höhere Empfindlichkeit des Peroxidase-EIA als auch die Sensitivitätsabstufungen im Phosphatase-EIA unter den drei Kopplungsprodukten erklären.

Die Heterologie von Enzym und Antigenen stellt wegen des "bridge recognition"-Phänomens einen weiteren Faktor für die Empfindlichkeit dar. Die Verwendung von 19-Nortestosteronglucuronid als Brücke hat sich wie schon im Enzymimmuntest für Trenbolon und DES (MEYER & HOFFMANN 1987) auch hier bewährt.

Die biotechnische Gewinnung des 19-Nortestosteronglucuronids wurde analog zu Trenbolonglucuronid durchgeführt. Obwohl der genaue Nortestosteron-Metabolismus beim Rind noch ungeklärt ist, konnte wegen der freien 17-Hydroxylgruppe des 19-Nortestosterons doch mit dem Erscheinen von konjugierten 17a-Epimeren im Urin gerechnet werden. Der Glucuronidierungsversuch stellte einen Provokationsversuch dar, in welchem das Kalb auf schnellstem Wege 900 mg Nortestosteron ausscheiden mußte. Dies geschah in der Hauptsache durch Konjugation des unveränderten 19-Nortestosteron-17B oder durch Epimerisierung zu 19-Nortestosteron-17a und anschließende Konjugation an Schwefel- bzw. Glucuronsäure. Andere Urinmetaboliten konnten nicht nachgewiesen werden.

Mit der Doppelantikörper-Technik nach MEYER und GÜVEN (1986) ließen sich im Gegensatz zur Direktbeschichtung von Platten mit hormonspezifischem Antikörper zeitabhängige Tendenzen innerhalb einer Mikrotitrationsplatte (MUNRO & STABENFELDT 1984) und erhöhte Varianzen innerhalb der Ergebnisse vermeiden (MEYER 1986). Der Enzymimmuntest nach der Doppelantikörper-Technik läßt sich durch die verbesserte Tiefkühl-Vorratshaltung der Mikrotitrationsplatten nach dem 2. Beschichten vereinfachen. Durch die Verwendung zimmerwarmer Waschlösung werden die Platten schneller und gleichmäßiger als im Kühlschrank aufgetaut. Mit der Verwendung von normalem Assaypuffer für die 2. Beschichtung wird ein Puffer eingespart. Der Einsatz eines Plattenwaschgerätes verkürzt die Testzeit. Die vorgestellten Verfahrensneuerungen haben keinen Einfluß auf die Empfindlichkeit der Eichkurve gezeigt.

Im Vergleich zum Radioimmuntest muß beim Enzymimmuntest auf Mikrotitrationsplatten mit erheblich kleineren Volumina gearbeitet werden. Deswegen stellt dieses Testsystem höhere Anforderungen an die genaue Einhaltung der Testbedingungen sowie an die Pipettiergenauigkeit. Bei Verwendung von Pipettiermaschinen können kleine Volumina exakt aufgetragen werden, doch sollte auf die Möglichkeit einer Verschleppung von höheren zu niedrigeren Konzentrationen beim Pipettieren von 20 µl Probe plus 100 µl Enzymverdünnung hingewiesen werden. Bei Umstellung der Testvolumina auf 50 µl Probe und 150 µl Enzymverdünnung verringert sich zwar die Konta-

minationsgefahr, jedoch zeigte sich, daß durch die volle Ausschöpfung der Volumenkapazität eines Reaktionsgefäßes auf der Mikrotitrationsplatte (300 µl statt 220 µl) keine Gleichgewichtseinstellung bei der Immunreaktion innerhalb von 24 Stunden erreicht wurde.

Insgesamt beurteilt ist der Enzymimmuntest für Nortestosteron als schnelles und praktikables Verfahren für das Screening von Urinproben geeignet. Die Variationskoeffizienten der Intra- und Interassayvariationen liegen für ein Routineverfahren in einem akzeptablen Bereich. Die Präzision der Messung ist im mittleren Abschnitt der Eichkurve und damit im interessanten Bereich sehr gut (100 - 114 %). Im Konzentrationsbereich um 1 ng/ml muß eine Urinprobe zumindest als fraglich eingestuft werden. Die Blindwerte im Urin liegen aufgrund der erheblichen Kreuzreaktionen des Nortestosteron-Antiserums wie auch im RIA relativ hoch. Aus diesem Grund müssen Befunde unter 1 ng/ml durch den HPLC-RIA bzw. HPLC-EIA abgeklärt werden.

Die Rückstandsanalytik ist durch die Anzahl in Frage kommender Hormonsubstanzen und deren mannigfaltige Metaboliten komplizierter geworden. Um analytischen Ansprüchen zu genügen und forensischen Forderungen gerecht zu werden hat es sich bewährt, ein schnelles und praktikables Routineverfahren für das "Screening" von Proben anzuwenden und positive Befunde durch zuverlässige Referenzverfahren bestätigen zu lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Trennleistung der HPLC für Steroide in zwei unterschiedlichen HPLC-Systemen mit UV-Detektion untersucht. Als weitere Differenzierungsmöglichkeit wurde der Radioimmun- bzw. Enzymimmuntest nach HPLC eingesetzt, um die Spezifität und die hohe Sensitivität der immunologischen Methoden zu nutzen und einen Nachweis im ppt-Bereich zu erreichen. Gewisse Probleme können durch Kreuzreaktionen des Antiserums mit verwandten Stoffen entstehen. In diesen Fällen muß eine eindeutige Differenzierung durch die HPLC gegeben sein. Das verwendete 19-Nortestosteron-Antiserum zeigt erhebliche Affinität zu weiteren 19-Nor-Steroiden, die am D-Ring modifiziert sind (z. B. Norethi-

steron 74 %). Durch kleinere Veränderungen am A- bzw. B-Ring, wie beispielsweise zusätzliche Methylgruppen, gehen die Kreuzreaktionen dagegen auf unerhebliche Werte zurück (z. B. Testosteron 0,2 %, Miboleron 0,3 %). Eine Erklärung dafür ist, daß für die Antigensynthese das 19-Nortestosteron über den D-Ring (17-Hydroxygruppe) an das Rinderserumalbumin gekoppelt wurde.

Von den physiologischen Steroiden werden Testosteron und Epitestosteron in beiden HPLC-Systemen von 19-NT-17a und -17b abgetrennt. Östradiol-17a, welches im Acetonitril-System vom 19-NT-17a nicht getrennt werden konnte, stört aufgrund seiner geringen Kreuzreaktion zum Nortestosteron-Antikörper (0,1 %) den Enzymimmuntest nicht. Progesteron wird ebenso wie die xenobiotischen Steroide Medroxyprogesteronacetat und Melengestrolacetat durch sehr lange Retentionszeiten in beiden Systemen klar vom Nortestosteron getrennt. Auch das Trenbolon (Kreuzreaktion von ca. 10 %) wird deutlich früher als 19-NT-17b eluiert. Norethisteron, Norethynodrel und Norgestrel sind im Methanolsystem leicht von 19-NT-17a und -17b zu unterscheiden. Bei den getesteten 19-Nor-Steroiden (Fa. Schering), die hauptsächlich am D-Ring modifiziert sind, waren aufgrund der Strukturähnlichkeiten zum 19-Nortestosteron erhebliche Kreuzreaktionen zu erwarten. Durch die HPLC ließen sich fast alle Verbindungen jedoch deutlich vom 19-NT-17a und -17b unterscheiden.

Die Bestimmung von Medroxyprogesteronacetat im HPLC/RIA ist unproblematisch, weil das MPA-Antiserum keine Kreuzreaktionen mit physiologischen Steroiden ($< 0,01$ %, CORNETTE et al. 1972)) zeigt und diese außerdem durch HPLC weit vom MPA abgetrennt werden. Auch Trenbolon kann im HPLC/RIA bzw. HPLC/EIA sicher nachgewiesen werden, da TBOH-17a und -17b klar von anderen Sexualhormonen abgetrennt wird und zudem der TBOH-Antikörper (gegen 17b-Trenbolon-HS-RSA) eine nur geringe Affinität zu Östradiol ($< 0,1$ %) und Nortestosteron (0,1 %) besitzt.

In der Verbindung von HPLC und RIA bzw. EIA ist somit eine Differenzierung der bisher genannten Substanzen eindeutig möglich. Obwohl im Methanolsystem eine detailliertere Auftrennung der Steroide erreicht wird, hat das Acetonitril-System Vorteile, wenn es darum geht, 19-Nortestosteron-17b zu messen.

Bei der Überprüfung biologischer Urinproben im Zusammenhang mit dem Hormonskandal in Norddeutschland 1985 hat sich die Kombination von HPLC und Radioimmunttest bewährt. Aufgrund einiger weniger Proben aus einem begrenzten Gebiet, in denen neben 19-NT-17a und -17b auch noch andere unbekannte Metaboliten gefunden wurden, sind Stoffwechselversuche mit Norethisteron, Norethynodrel und Norgestrel beim Kalb durchgeführt worden. Auch hier traten neben den jeweiligen Originalsubstanzen und dem 19-NT-17a noch weitere unbekannte Metaboliten auf, deren Natur sich mit zwei eindimensionalen HPLC-Passagen (Methanol- und Acetonitril-System) und anschließendem Enzymimmunttest nicht klären ließ. Durch Systemvarianten sowohl bei der HPLC als auch beim Enzymimmunttest könnte eine zusätzliche Absicherung vorgenommen werden. Dafür kommen als Möglichkeiten neben der Verwendung anderer Lösungsmittel für die HPLC (z.B. "normal phase"-Systeme, JANSEN et al. 1985, MORETTI et al. 1985) die zweidimensionale HPLC sowie die Verwendung von Antiseren unterschiedlicher Spezifität in Betracht. HAMPL & STARKA (1979) beschrieben in diesem Zusammenhang einen Radioimmunttest für 19-Nortestosteron, wobei sie ein Gemisch aus zwei Antiseren einsetzten. Durch das optimierte Mischungsverhältnis der Antiseren konnten die Kreuzreaktionen einiger physiologischer Steroidmetaboliten verringert werden. Als weitere Möglichkeit ist der Paralleleinsatz zweier Antiseren im Immunttest denkbar.

Bei der Untersuchung der Injektionsstellen wurden die Muskelportionen, welche die Applikationsstellen enthielten, bewußt in ihrer Gesamtheit aufgearbeitet und anschließend die Konzentrationen anhand eines Aliquots bestimmt, da eine Aussage über die Rückstandsmengen gemacht werden sollte, die der Verbraucher beim Verzehr einer solchen kontaminierten Fleischportion zu sich nehmen könnte. Die höchsten Rückstände nach Applikation eines illegalen Hormoncocktails wurden von 3,3 mg NT-dekanat pro Gesamtinjektionsstelle gefunden. Beim Mann wird mit 100 mg NT/Woche i.m. über 13 Wochen neben einer zuverlässigen anabolen Wirkung eine LH-, FSH- und Testosterondepression sowie eine Azoospermie erreicht (SCHUERMEYER et al. 1984). Diese hormonellen Wirkungen treten jedoch nur bei parenteraler Applikation auf, da Nortestosteron eine nur geringe orale Wirksamkeit beim Menschen (POTTS et al. 1976) besitzt.

Vom Östradiolbenzoat konnten nach Verabreichung von 180 mg nach 18 Tagen noch 2,9 mg gefunden werden. Nach HERR et al. (1970) beträgt die Dosis Östradiol-17 β , mit welcher eine Entzugsblutung bei 50 % der Frauen ausgelöst wird, ca. 2 mg/Tag über einen Zeitraum von 3 Wochen. Damit erreicht die in einer Injektionsstelle enthaltene Östrogenmenge die kritische Konzentration einer Tagesdosis. Von der einmaligen Aufnahme einer solchen Östrogenmenge ist zwar bei der Frau keine Blutungsinduktion zu erwarten, die Menge reicht aber sicherlich aus, um kurzfristig den endogenen Hormonstatus zu beeinflussen. Vorübergehende Auswirkungen auf das endokrine System sind auch beim heranwachsenden Jungen möglich, wenn man bedenkt, daß die minimale orale Dosis zur LH-Depression einmalig ca. 0,5 mg Östradiol beträgt (BIDLINGMAIER 1981).

Gegenüber den beiden erstgenannten Substanzen besitzt das Medroxyprogesteronacetat eine starke orale Wirksamkeit. Für eine Blutungsinduktion ist eine tägliche Dosis von 2,5 - 10 mg MPA über 5-7 Tage erforderlich (ROTE LISTE 1982). Eine derart hohe Konzentration konnte in keiner der untersuchten Injektionsstellen gefunden werden.

Insgesamt beurteilt sind beim einmaligen Verzehr von rückstandsbelasteten Injektionsstellen mit den ermittelten hohen Konzentrationen an NT-dekanat, Östradiolbenzoat und MPA nur kurzfristige endokrine Beeinflussungen beim Menschen zu erwarten. Im Gegensatz dazu könnten bei Aufnahme niedrigerer Dosen über einen längeren Zeitraum stärkere hormonelle Effekte entstehen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte die Möglichkeit einer Kontamination von Baby-nahrung kritisch beurteilt werden.

Ein anderer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, daß die unästhetischen Veränderungen im Bereich der Injektionsstelle, wie sie durch die Gewebsunverträglichkeit des illegalen Hormoncocktails entstanden sind, keinem Verbraucher zuzumuten sind, der ein äußerlich einwandfreies Bratenstück gekauft zu haben glaubt.

Im Interesse des Verbraucherschutzes müssen daher Monitoring-Programme aufrecht erhalten bleiben, wofür in vorliegender Arbeit Beiträge für neue methodische und praktikable Lösungen aufgezeigt wurden.

V. Zusammenfassung

Für die Bestimmung von 19-Nortestosteron wurde ein hochempfindlicher Enzymimmuntest auf Mikrotitrationsplatten entwickelt. Die Enzymmarkierung wurde durch Kopplung von 19-Nortestosteron-glucuronid (Östra-4-en-3-on-17a-yl- β ,D-glucopyranosiduronsäure), welches biotechnisch über das Kalb gewonnen wurde, an alkalische Phosphatase und Meerrettich-Peroxidase nach der gemischten Anhydrid-Methode vorgenommen. Es wurden 3 verschiedene Kopplungsprodukte an alkalische Phosphatase mit unterschiedlichen molaren Ausgangskonzentrationen von Enzym und Hormon hergestellt. Die Phasentrennung erfolgte nach der Doppelantikörper-Methode, wobei Schaf-IgG (anti-Kaninchen-IgG) als 1. Antikörper und das 19-Nortestosteron-Antiserum (gegen 19-Nortestosteron-17 β -hemisuccinat-RSA aus Kaninchen) als 2. Antikörper fungierten.

Unter Verwendung des Peroxidase-Kopplungsprodukts lagen 50 % rel. Bindung der Eichkurve bei 5 pg, unter Verwendung der Phosphatase-Kopplungsprodukte zwischen 8 und 70 pg (RIA: 120 pg), wobei dasjenige Hormon-Phosphatase-Konjugat mit dem niedrigsten Hormon-Enzymverhältnis die empfindlichste Eichkurve lieferte. Die Meßergebnisse parallel im RIA und EIA bestimmter Urinproben (n=60) zeigten eine gute Übereinstimmung ($r=0,97$). Die Blindwerte von Urinproben (n=8) liegen im EIA $< 0,7$ ng/ml. Positive biologische Urinproben > 1 ppb werden mit großer Sicherheit bestimmt.

Die Kombination von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Enzymimmuntest für Nortestosteron eignet sich für die Absicherung positiver Urinbefunde im ppt-Bereich, sollte aber wegen der hohen Kreuzreaktionen des 19-Nortestosteron-Antiserums auch für positive Befunde im Bereich < 10 ng/ml durchgeführt werden.

Die Selektivität der HPLC bezüglich der Trennung physiologischer und xenobiotischer Steroidhormone wurde in Abhängigkeit von zwei Elutionsmitteln untersucht. Bei Verwendung einer hochauflösenden Säule erwies sich sowohl das Methanol-System als auch das Acetonitril-System als leistungsfähig. Im Methanol-System wird zwar eine detailliertere Auftrennung der Steroide erreicht, jedoch hat das Acetonitril-System Vorteile bei der Abtrennung von 19-Norte-

stosteron-17 β .

In Injektionsversuchen am Kalb wurde die unsachgemäße intramuskuläre Applikation eines nichtdeklarierten Hormoncocktails (0,6 % MPA, 1,8 % Östradiolbenzoat, 2,6 % NT-dekanat) simuliert und die Rückstandsmengen von 4 bzw. 10 ml Injektionslösung in den Injektionsstellen nach unterschiedlich langen Wartezeiten untersucht. Als höchste Rückstandsmengen nach 18 Tagen wurden 0,6 mg MPA, 2,9 mg Östradiolbenzoat und 3,3 mg NT-dekanat in einer Gesamteinjektionsstelle gefunden.

In Stoffwechselversuchen wurde die Ausscheidung von Norethisteron, Norethynodrel und Norgestrel im Urin beim Kalb mittels HPLC/EIA im Methanol- und Acetonitril-System untersucht. Bei Norethisteron und Norethynodrel wurden neben den jeweiligen Originalsubstanzen und 19-Nortestosteron-17a noch andere unbekannte Metaboliten gefunden. Beim Norgestrel lagen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

Bei der Untersuchung der Urinproben von Antibiotika-behandelten Kühen wurde überprüft, ob Kreuzreaktionen des 19-NT-Antiserums zu Urinmetaboliten bestehen. Die gefundenen Werte lagen im Bereich der Blindwerte für negative Urinproben von Kälbern.

Schließlich wurde ein HPLC-EIA für Trenbolon in Muskulatur ausgearbeitet, bei dem die Probenaufarbeitung, die Probenauftragsmenge und die Fraktionsgröße so aufeinander abgestimmt sind, daß die den HPLC-Fractionen entnommenen Aliquots unmittelbar in den Enzymimmuntest eingesetzt werden, so daß Trenbolon-17 β in Mengen von 50 pg/g Muskulatur eindeutig nachzuweisen ist.

VI. Summary

Development of methods and pilot experiments concerning the analytical control of illegal application of anabolics in veal calves.

A highly sensitive, solid phase microtitration plate enzyme immunoassay has been developed for nortestosterone. Alkaline phosphatase and horseradish-peroxidase were coupled following mixed anhydrid reaction to 19-nortestosterone-glucuronide (estra-4-en-3-on-17a-yl- β ,D-glucopyranosidurone acid), which had been produced biotechnically by calf. Three conjugates were produced using different molar ratios of alkaline phosphatase and hormone. Phase separation was achieved by double-antibody technique with sheep IgG antirabbit IgG as first antibody and hormone specific anti-serum (anti-19-nortestosterone-17 β -HS-BSA raised in rabbits) as second antibody.

Sensitivity of the standard curve reached 5 pg (50 % of relative binding of the standard curve) when using the peroxidase label and between 8 and 70 pg when using the phosphatase labels (compared to RIA: 120 pg). The phosphatase conjugate with the lowest molar ratio delivered the most sensitive standard curve among the three different phosphatase labels. The results of biological urine samples measured by RIA and EIA showed a good agreement ($r > 0,97$). The urine sample blanks ($n = 8$) in nortestosterone enzyme immunoassay were $< 0,7$ ng/ml. Positive urine samples > 1 ppb were measured with great confidence.

The combination of high performance liquid chromatography and nortestosterone enzyme immunoassay proved the reliability of positive results from urine samples on the ppt-level, but the high cross reactions of nortestosterone antibody makes the validation also necessary for positive results < 10 ng/ml.

The selectivity of HPLC for separation of physiological and xenobiotic steroids was examined in dependence of two different elution fluids. Both the methanol system and the acetonitril system proved to be efficient when using a highly separating HPLC column. A better distinction between the steroids is achieved by the use

of the methanol system, whereas the acetonitril system offers advantage for the isolation of 19-nortestosterone-17 β .

The intramuscular application of an illegal hormone cocktail (0,6 % medroxyprogesterone acetate, 1,8 % estradiol benzoate, 2,6 % nortestosterone decanate) was simulated and hormone residues of the application sites after injection of 4 and 10 ml cocktail were examined. The maximum of total amounts of hormones was found after a 18 day period with 0,6 mg medroxyprogesterone acetate, 2,9 mg estradiol benzoate and 3,3 mg nortestosterone decanate.

A study for the metabolism of norethisterone, norethynodrel and norgestrel in veal calf was made and the concentrations of the metabolites were determined by HPLC/EIA using the methanol and the acetonitril system. Norethisterone and norethynodrel were found to have the original substances and 19-nortestosterone-17a as urine metabolites besides some other unknown metabolites. The results for norgestrel were under the detection limit.

Possible cross reactions of the nortestosterone antiserum to urine metabolites of antibiotics were analysed by the examination of urine samples from treated cows. The results were within the concentrations of urine sample blanks from calves.

At last a HPLC/EIA for trenbolone in muscle was elaborated in which the purification of samples, the concentration of the chromatographed aliquots and the size of the collected fractions were well arranged in order to detect amounts of 50 pg TBOH/g muscle precisely.

VII. Literaturverzeichnis

Aibara S., Yamashita H., Mori E., Kato M., Morita Y.

Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase

J. Biochem. 92: 531-539 (1982)

Babcock J.C., Gutsell E.S., Herr M.E., Hogg J.A., Stucki J.C., Barnes L.E., Dulin W.E.

6a-Methyl-17a-hydroxyprogesterone-17-acylates, a new class of potent progestins

J. Am. Chem. Soc. 92: 87-99 (1953)

Belkien L., Schuermeyer T., Hano R., Gunnarson P.O. Nieschlag E.

Pharmacokinetics of 19-nortestosterone esters in normal men

J. Steroid Biochem. 22(5): 623-629 (1985)

Bidlingmaier F.

Physiologie und Regulation der Sexualhormone im Säuglingsalter
In: Diätet. Lebensmittel in Praxis und Wissenschaft-Sicherheit
in der Diätetik-, 33. Colloqu. zur Problematik eines synthetischen Östrogengehalts in Babykost

Schriftenreihe des Bundesverbandes der Diätetischen Lebensmittelindustrie e.V., H. 57, 214-217 (1981)

Both-Miedema R., Van Groenestein T.J.A., De Groot W.C., Huis in't Veld L.G., Rijdsdijk J.C.J.M., Stekelenburg P.

19-nortestosterone. I. Its metabolism in the rabbit

Ster. Lip. Research 3(1): 49-58 (1972)

Brüggemann J., Richter O.

Hormone in der Tiermast

Fortschr. Tierphys. Tierern.

Beiheft 6 Zt. Tierphys. Tierern. Futtermittelk.

Verlag P. Parey, Hamburg Berlin (1976)

Castegnaro E., Sala G.

Isolation and identification of 6 β -17 α ,21-trihydroxy-6 α -methyl-4-pregnene-3,20-dione (21-acetate) from the urine of human subjects treated with 6 α -methyl-acetoxypregesterone
J. Endocrinol. 24: 445-452 (1962)

Cornette J.C., Kirton K.T., Duncan G.W.

Measurement of medroxyprogesterone acetate (Provera) by radio-immunoassay
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 33: 459-466 (1971)

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Lieberman S.

Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone
J. Biol. Chem. 228: 713-727 (1957)

Exley D.

The influence of heterology and homology on enzyme immunoassay in: Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs
Walter de Gruyter & Co. Berlin/New York, 207-219 (1978)

Fraser I.S., Weisberg E.

A comprehensive review of injectable contraception with special emphasis on depot medroxyprogesterone acetate
Med. J. Aust. (Suppl.) 1: 3-19 (1981)

Frischkorn C.G.B., Dürbeck H.W.

Über die Bestimmung von anabolen Steroiden und deren Metaboliten in biologischen Materialien
Fresenius Z. Anal. Chem. 290: 160-161 (1978)

Fukushima D.K., Levin J., Liang J.S., Smulowitz M.

Isolation and partial synthesis of a new metabolite of medroxyprogesterone acetate
Steroids 34: 57-72 (1979)

Gropp J., Boehncke E., Schulz V., v. Sandersleben J., Geisel O., Hänichen T.

Die Wirkung von 17 β -Östradiol und Trenbolonacetat in unterschiedlicher Dosierung auf verschiedene physiologische und morphologische Parameter (Provokationsversuch)

in: Anaboloka in der Kälbermast

Hrsg. Brüggemann J. und Richter O.

Beiheft 6 Zt. Tierphys. Tierern. Futtermittelk., 33 -52

Verlag P. Parey, Hamburg Berlin (1976)

Haml R., Putz Z., Bicikova M., Starka

Advances in immunoassay of anabolic steroids

Anal. Chem. Symp. Ser. 23: 219 - 224 (1985)

Haml R., Starka L.

Screening of anabolic steroids in doping control

J. Steroid Biochem. 11: 933-936 (1979)

Helmreich M.L., Huseby R.A.

Identification of 6,21-dihydroxylated metabolite of medroxyprogesterone acetate in human urine

J. Clin. Endocrinol. Metab. 22: 1018-1032 (1962)

Herbst A.L., Ulfelder H., Poskanzer D.C.

Adenocarcinoma of the vagina

N. Engl. J. Med. 284: 878 - 881 (1971)

Herr F., Revesz C., Manson A.J., Jewell J.B.

Biological properties of estrogen sulfates

in: Chemical and biological aspects of steroid conjugation

Hrsg.: S. Bernstein, S. Solomon; Springer Verlag Berlin,

Heidelberg , New York; S. 368-408 (1970)

Hershberger L.G., Shipley E.G., Meyer R.K.

Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83: 175-180 (1953)

Hoffmann B., Karg H., Vogt K., Kyrein H.J.

Aspekte zur Anwendung, Rückstandsbildung und Analytik von
Sexualhormonen bei Masttieren

in: DFG Forschungsbericht "Rückstände in Fleisch und Fleisch-
erzeugnissen", 32 - 59

H. Boldt Verlag, Boppard (1975)

Hoffmann B., Oettel G.

Radioimmunoassays for free and conjugated trienbolone and
trienbolone acetate in bovine tissue and plasma samples

Steroids 27, 509-523 (1976)

Houghton E.

Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the
horse: 19-nortestosterone

Xenobiotica 7: 683-693 (1977)

Houghton E., Dumasia M.C.

Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the
horse: the identification of some 16-oxygenated metabolites of
19-nortestosterone

Xenobiotica 10: 381-390 (1980)

Houghton E., Oxley G.A., Moss M.S

Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the
horse: a gas chromatographic mass spectrometric method to con-
firm the administration of 19-nortestosterone or its esters to
horses

Biomed. Mass Spectrom. 5: 170-173 (1978)

Jansen E.H.J.M., Van den Berg R.H., Enkelaar-Willemsen C., Van
Blitterswijk H., Stekelenburg P., Both-Miedema R., Stephany R.W.

19-nortestosterone in urine of slaughtered cattle illegally
injected with anabolic preparations

RIVM Bericht Nr.368301 016 (1986a)

Jansen E.H.J.M., Van den Berg R.H., Enkelaar-Willemsen C., Both-Miedema R., Zomer G., Stephany R.W.

Urinary and fecal excretion of 19-nortestosterone by veal calves injected with an anabolic combination of nortestosterone dodecanoate and estradiol benzoate

RIVM Bericht Nr. 368301 015 (1986b)

Jansen E.H.J.M., Freudenthal J., Van Rossum H.J., Litjens J.L.M., Stephany R.W.

Quantitative determination of diethylstilbestrol in bovine urine with isotope dilution mass spectrometry

Biomed. Environm. Mass Spectrom. 13: 245-249 (1986c)

Jansen E.H.J.M., Van den Berg R.H., Zomer G., Stephany R.W.

A specific radioimmunoassay for the detection of 19-nortestosterone in urine

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23: 145-150 (1985a)

Jansen E.H.J.M., Van den Berg R.H., Zomer G., Both-Miedema R., Enkelaar-Williemsen C., Stephany R.W.

Combination of high-performance liquid chromatography and chemiluminiscent immunochemical detection of hormonal anabolics and their metabolites

Anal. Chim. Acta 170: 21-27 (1985b)

Jansen E.H.J.M., Zoontjes P.W., Both-Miedema R., Van Blitterswijk H., Stephany R.W.

Screening of parts-per-billion levels of diethylstilbestrol in bovine urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection

J. Chromatogr. 347: 379-383 (1985c)

Jansen E.H.J.M., Van Blitterswijk H., Stephany R.W.

Monitoring and identification of residues of anabolic preparations in slaughtered cattle by HPLC with diode array detection

The Vet. Quart. 6(2): 60-65 (1984)

Jondorf W.R.

19-nortestosterone, a model for the use of anabolic steroid conjugates in raising antibodies for radioimmunoassay
Xenobiotica 11: 671-681 (1977)

Karg H.

Was ist von der Östrogenmast zu halten?
Der Tierzüchter 16, 805 - 809 (1964)

Karg H., Meyer H.H.D., Vogt K., Landwehr M., Hoffmann B., Schopper D.

Residues and clearance of anabolic agents in veal calves
in: Manipulation of growth in farm animals
Hrsg. J. R. Roche/D. O'Callaghan; M. Nijhoff Publishers
Boston, Den Haag, Lancaster. S. 34-60 (1984)

Lu F.C., Rendel J.

Anabolic agents in animal production
FAO/WHO Symp., Rome 1975
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

Martin F., Adlercreutz H.

Aspects of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate metabolism
in: Pharmacology of steroid contraceptive drugs
Hrsg.: S. Garrattini/H.W. Berendes, Raven Press, New York;
S. 99-115 (1977)

Martin F., Järvenpää P., Konsunen K., Sommers C., Lindstrom B., Adlercreutz H.

Ring-A reduction of medroxyprogesterone acetate [17 α -acetoxy-6 α -methyl-4pregnene-3,20-dione (MPA)] in biological systems
J. Steroid Biochem. 12: 491-497 (1980)

Meyer H.H.D.

Possibilities to improve enzyme immunoassay (EIA) techniques
and their application in animal production
Lecture given at the International Symposium on the use of
nuclear techniques in studies of animal production and health
in different environments, Vienna, Austria, 17-21 March 1986,
abstract no. IAEA-SM-292/31 (1986)

Meyer H.H.D., Gregor R.

Die Anwendung eines Östronsulfat-Tests auf Mikrotitrations-
platten zur Graviditätsdiagnostik beim Rind
in: Proceedings of X. Veterinär-Humanmed. Gemeinschaftstagung
"Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung"
Hrsg.: K. Semm/J. Hahn/D. Rohloff/L. Mettler, Kiel: Deutsche
Gesellschaft zum Studium der Fertilität und Sterilität /Dtsch.
Vet.Med. Gesellschaft, S. 120-124 (1985)

Meyer H.H.D., Güven B.

Improvement of microtitration plate enzyme immunoassays for
steroid determination by a "second antibody technique"
J. Steroid Biochem. 25: Suppl. Abstract 139 (1986)

Meyer H.H.D., Hoffmann S.

Development of a sensitive microtitration plate enzyme-
immunoassay for the anabolic steroid trenbolone
Food Addit. Contamin. 1(3): (1987)

Meyer H.H.D., Landwehr M., Schopper D., Karg H.

Application of Synovex-H in veal calves: Steroid release and
residues
Food Additives and Contaminants, 1, 261 - 275 (1984)

Meyer H.H.D., Herges C., Landwehr M., Karg H.

Möglichkeiten der Erkennung des illegalen Einsatzes von
Östradiolbenzoat in der Kälbermast durch Steroidöstrogenbe-
stimmung in Kot und Blutplasma
Archiv für Lebensmittelhyg. 36, 27 - 31 (1985)

Meyer H.H.D., Güven B., Karg H.

Enzymimmuntests (EIA) auf Mikrotitrationsplatten zur Progesteronbestimmung in Magermilchproben

Wiener Tierärztl. Monatsschr. 73: 86-94 (1986)

Moretti G., Cavina G., Alimenti R., Cammarata P., Valvo L.

HPLC analysis of steroid formulations, acting as anabolics, unlawfully used in veterinary

Anal. Chem. Symp. Ser. 23: 471-477 (1985)

Munro C., Stabenfeldt G.

Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone

J. Endocr. 101: 41-49 (1983)

Neumann F.

Pharmacological and endocrinological studies on anabolic agents

in: Anabolic agents in animal production

Hrsg.: F.C. Lu/J. Rendel; G. Thieme Verlag Stuttgart, S. 253-264 (1976)

Portmann P., Jörg A., Furrer K., Walker H., Leuthard P., Sudan J., Perriard F., Comment J., Leva G., Nell J.

Calf intestinal alkaline phosphatase I. Improved isolation method and molar composition of the purified phosphatase

Helv. Chim. Acta 65: 2668-2681 (1982)

Potts G.O., Arnold A., Beyler A.L.

19-nortestosterone-derived protein anabolic steroids

in: Anabolic-androgenic steroids

Hrsg.: C.D. Kochakian Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S. 378-406 (1976)

Rapp M.

Entwicklung sensitiver, praktikabler Verfahren zum Nachweis sexualhormonwirksamer steroidaler Anabolika bei der Rindermast und Untersuchungen zu deren Wirkungsmechanismus

Diss. rer. nat. Technische Universität München (1986)

Rapp M., Meyer H.H.D.

Nachweismöglichkeiten des Trenboloneinsatzes in der Rinder-
mast: Radioimmupologische Bestimmung und Validierung der Er-
gebnisse mittels HPLC/RIA

Arch. Lebensmittelhyg. 36: 31-36 (1985)

Rapp M., Meyer H.H.D.

Untersuchungen von illegalen nicht deklarierten Injektionsprä-
paraten auf sexualhormonwirksame steroidale Anabolika und Ent-
wicklung eines Radioimmuntests für 19-Nortestosteron

Arch. Lebensmittelhyg., eingereicht (1987)

Rote Liste

Verzeichnis von Fertigarzneimitteln der Mitglieder des Bundes-
verbandes der Pharmazeutischen Industrie e.V.

Editio Cantor Aulendorf / Württ. (1982)

Sala G., Camerino B., Cavallero C.

Progestational activities of 6a-methyl-17a-hydroxy-
progesterone acetate

Acta Endocrinol. 29: 508-512 (1958)

Schallenberger E., Schöndorfer A.M., Walters D.L.

Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile
changes of concentrations in the jugular vein throughout the
oestrus cycle

Acta Endocrinol. 108: 312-321 (1985)

Schuermeyer T., Knuth U.A., Belkien L., Nieschlag E.

Reversible azoospermia induced by the anabolic steroid 19-
nortestosterone

Acta Endocrin. 264: 60 (1984)

Shindler J.S., Childs R.E., Bardsley W.G.

Peroxidase from human cervical mucus. The isolation and
characterisation

Can. J. Biochem. 65: 325-331 (1976)

Shrimanker K., Saxena B.N., Fortherby K.

A radioimmunoassay for serum medroxyprogesterone acetate
J. Steroid Biochem. 9: 359-363 (1978)

Sletholt K.

Radioimmunoassay of 6a-methyl-17a-acetoxypregesterone (MPA) in
plasma of sheep during and after oral administration
Acta Endocr. 96: 141-144 (1981)

Starka L., Chundela B., Hampl R.

Analysis of anabolic steroids in doping control
in: Advances in steroid analysis.
Hrsg.: S. Görög, Akademiai kiado, Budapest, S. 55-71 (1982)

Trenkle A.

The anabolic effect of estrogens on nitrogen metabolism of
growing and finishing cattle and sheep
in: Anabolic agents in animal production
FAO/WHO Sympos. Rom, März 1975
Hrsg. F.C. Lu, J. Rendel, G. Thieme Verlag,
Stuttgart, S. 79 (1976)

Van der Wal P., Berende P.L.M., Sprietsma J.E.

Effect of anabolic agents on performance of calves
J. Anim. Sci. 41, 978 - 985 (1975)

Van de Wiel D.F.M., Koops W.

Direct measurement of progesterone in milk and plasma by a
sensitive and simple enzyme immunoassay
Brit. Vet. J. 138: 454-459 (1982)

Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.

The influence of heterologous combinations of antiserum and
enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen
enzyme-immunoassays
Immunochemistry 12: 667-670 (1975)

Van Weerden E.J., Berende P.L.M., Huisman J.

Application of endogenous and exogenous anabolic agents in
veal calves

Proceed. CEC-Workshop "Anabolic agents in beef and veal pro-
duction", 5./6. März 1981, Brüssel; S. 1-26 (1981)

Vogt K.

Nachweis von 19-Nortestosteron und Trenbolon mit Hilfe eines
heterologen Radioimmuntests

Arch. f. Lebensmittelhyg., eingereicht (1987)

Lebenslauf

Funcke, Arndt-Peter geb. am 19.06.1951 in Dortmund als Sohn
des Kaufmanns Paul-Hermann Funcke und
seiner Ehefrau Gerda Funcke, geb. Liebelt

Schulbildung 1958 - 1963 Volksschule in Dortmund
1963 - 1974 Besuch des humanistischen
Gymnasiums in Dortmund
Abitur 6.06.1974

Wehrdienst 1974 - 1976 in Nienburg/Weser

Berufstätigkeit 1976 - 1979 als Bundeswehroffizier in
Nienburg/Weser

Universitätsstudium 1979 - 1985 Tiermedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Staatsexamen 19.12.1985

Approbation als Tierarzt 31.01.1986

Seit September 1985 als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut
für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan der Technischen Universität
München beschäftigt. Während dieser Zeit wurde die Dissertation
angefertigt.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg danke ich für die Themenstellung und für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten in dem von ihm geleiteten Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heinrich H.D. Meyer für seine wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit sowie für seine Anregungen und Ratschläge.

Bei Herrn Dr. Martin Rapp bedanke ich mich für die vielen Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Teamgeist und Arbeitsatmosphäre.

Für die Bereitstellung der Mittel zur Entwicklung des Enzymimmuntests für 19-Nortestosteron sei dem Landwirtschaftsministerium Niedersachsen gedankt.

